

Aus der Medizinischen Klinik für Nephrologie und Hypertensiologie  
Campus Charité Buch  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss des periadventitiellen Fettgewebes auf die  
Kontraktilität von Arterien der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Verlohren

aus Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Gollasch  
2. Prof. Dr. med. H. Haller  
3. PD Dr. med. R. Schubert

Datum der Promotion: 17.06.2005

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Adipositas und die Blutgefäße</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b>Die arteriellen Blutgefäße</b>	<b>7</b>
2.2.1	Das Endothel der Blutgefäße	7
2.2.1.1	Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF)	8
2.2.1.2	Prostazyklin (PGI <sub>2</sub> )	9
2.2.1.3	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)	9
2.2.2	Die Media der Blutgefäße	11
2.2.2.1	Glatte Gefäßmuskelzellen	11
2.2.2.2	Die Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskelzelle	11
2.2.2.2.1	ATP-abhängige K <sup>+</sup> (K <sub>ATP</sub> )-Kanäle	12
2.2.2.2.2	Einwärtsgerichtete K <sup>+</sup> (K <sub>ir</sub> )-Kanäle	13
2.2.2.2.3	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte K <sup>+</sup> (K <sub>Ca</sub> <sup>2+</sup> )-Kanäle	13
2.2.2.2.4	Spannungsabhängige K <sup>+</sup> (K <sub>v</sub> )-Kanäle	15
2.2.2.3	Intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle	16
2.2.2.3.1	Proteinkinase A (PKA)	16
2.2.2.3.2	Tyrosinkinase	17
2.2.2.3.3	Proteinkinase G (PKG)	18
2.2.3	Die Adventitia und das perivaskuläre Fettgewebe	18
2.2.3.1	Arten des perivaskulären Fettgewebes	18
2.2.3.2	Fettgewebe: Eigenschaften und Funktion	19
<b>2.3</b>	<b>Die Entdeckung des Adventitium-Derived Relaxing Factor (ADRF)</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Hypothese und Herleitung der Aufgabenstellung</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Präparation der Untersuchungsgefäße</b>	<b>25</b>
3.2.1	Präparation der Mesenterialarterie	25
3.2.2	Präparation der Aorta	27
<b>3.3</b>	<b>Isometrische Kontraktionsmessung an der Mesenterialarterie</b>	<b>29</b>
3.3.1	Das Prinzip der isometrischen Kontraktionsmessung	29
3.3.2	Protokolle	30

3.3.3	Datenerfassung	32
3.3.4	Datenanalyse und Auswertung	33
<b>3.4</b>	<b>Isometrische Kontraktionsmessung an der Aorta</b>	<b>33</b>
3.4.1	Protokolle	33
3.4.2	Datenerfassung und Auswertung	35
<b>3.5</b>	<b>Reagenzien und Chemikalien</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Regulation der ADRF-Freisetzung aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Rattenaorta</b>	<b>37</b>
4.1.1	Kalziumabhängigkeit der ADRF-Freisetzung	37
4.1.2	Reversibilität der ADRF-Wirkung	38
4.1.3	Regulation der ADRF-Freisetzung über PKA	39
4.1.4	Regulation der ADRF-Freisetzung über Tyrosinkinase	43
4.1.5	Regulation der ADRF-Freisetzung über PKG	48
<b>4.2.</b>	<b>Untersuchungen über die Wirkung und den Wirkmechanismus von ADRF an der Mesenterialarterie</b>	<b>50</b>
4.2.1	Antikontraktiler Effekt der perivaskulären Fettgewebes	50
4.2.1.1	Serotonin	50
4.2.1.2	Phenylephrin	51
4.2.1.3	Endothelin I	52
4.2.1.4	U 46619	53
4.2.2	Longitudinales Entfernen von 50 % des periadventitiellen Fettgewebes	54
4.2.3.	Ausschluss der endothelialen Vasodilatation	55
4.2.4	Die Rolle von Kaliumkanälen für den antikontraktilen Effekt des periadventitiellen Fettgewebes	56
4.2.5	Reaktion von U46619-kontrahierten Gefäßringen auf den Kaliumkanalöffner Cromakalim	57
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung des an der Vermittlung des antikontraktilen Effekts beteiligten Kaliumkanaltyps durch Einsatz von Kaliumkanalblockern</b>	<b>59</b>
4.3.1	K <sub>ATP</sub> -Kanäle	60
4.3.2	K <sub>Ca</sub> <sup>2+</sup> -Kanäle	63
4.3.2.1	BK-Kanäle	64
4.3.2.2	SK-Kanäle	65
4.3.3	Unspezifische Kaliumkanalblocker	66
4.3.4	K <sub>V</sub> -Kanäle	68

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchung des Freisetzungsmechanismus von ADRF an der Aorta</b>	<b>72</b>
5.1.1	Kalziumabhängigkeit der ADRF-Freisetzung	72
5.1.2	Die Rolle intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle für die Freisetzung von ADRF an der Aorta	73
5.1.2.1	PKA	73
5.1.2.2	Tyrosinkinase	75
5.1.2.3	PKG	77
<b>5.2</b>	<b>Antikontraktiler Effekt des periadventitiellen Fettgewebes auf die Mesenterialarterie der Ratte</b>	<b>79</b>
5.2.1	Dosisabhängigkeit der Kontraktilität	79
5.2.2	Die Rolle von Kaliumkanälen	81
5.2.3	U 46619 und Cromakalim	82
5.2.4	K <sub>V</sub> -Kaliumkanäle als Vermittler des antikontraktilen Effekts an der Mesenterialarterie der Ratte	83
5.2.4.1	Differentielle K <sub>ATP</sub> -Kanal-Expression in verschiedenen VSMC	85
5.2.4.2	Differentielle K <sub>V</sub> -Kanal-Expression	86
5.2.4.3	Unspezifische Stimulation durch TEA und TPcA	89
5.2.4.4	Verschieden ADRFs? Eine Analogie zu EDHF	90
<b>5.3</b>	<b>Perivaskuläres Fettgewebe und adipozytäre Dysfunktion – klinischer Bezug</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>108</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>110</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung</b>	<b>111</b>

# 1 **Abkürzungsverzeichnis**

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADRF	Adventitium-Derived Relaxing Factor
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
BK	Kalzium-aktivierter Kaliumkanal großer Leitfähigkeit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat Kohlendioxid
CB	Cannabinoid
CGRP	Calcitonin-gene related peptide
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX	Zyklooxygenase
CYP450	Zytochrom-P-450
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EET	Epoxyeikosatriensäure
EETeTR	Epoxyeicosatetraensäure
(+)fat	Gefäßringe mit perivaskulärem Fettgewebe
(-)fat	Gefäßringe ohne perivaskuläres Fettgewebe
g	Gramm
GC	Guanylatzyklase
GDP	Guanosindiphosphat
IK	Kalzium-aktivierter Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal
K <sub>Ca</sub> <sup>2+</sup> -Kanal	Ca <sup>2+</sup> -aktivierte K <sup>+</sup> -Kanal
K <sub>ir</sub> -Kanal	einwärtsgerichteter K <sup>+</sup> -Kanal
K <sub>V</sub> -Kanal	spannungsabhängiger K <sup>+</sup> -Kanal
KCl	Kaliumchlorid
m	Meter

μ	Mikro
m	Milli
MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
Min	Minuten
M	Molar
n	Nano
N	Newton
NDP	Nukleosiddiphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
P	Piko
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PSS	Physiologische Kochsalzlösung
S	Siemens
SK	Kalzium-aktivierter Kaliumkanal kleiner Leitfähigkeit
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
TPR	Totaler Peripherer Widerstand
TK	Tyrosinkinase
V	Volt
vs.	versus
UDP	Uridindiphosphat
vgl.	vergleiche
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle (Vascular Smooth Muscle Cell)

## **2            *Einleitung***

### **2.1            *Adipositas und die Blutgefäße***

Adipositas ist zu einem bedeutenden Gesundheitsproblem in den westlichen Industriestaaten geworden (McLellan *et al.*, 2002). Fast 60 Prozent der erwachsenen amerikanischen Bevölkerung sind übergewichtig, mit steigender Prävalenz auch in der jugendlichen Bevölkerung und mit negativen Folgen für Morbidität und Mortalität (Must *et al.*, 1999).

Adipositas ist häufig assoziiert mit Hypertonus, Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ II, den drei wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren für das Auftreten von Atherosklerose und kardiovaskulären Krankheiten (Chen *et al.*, 1999). Übergewicht ist als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor in den Brennpunkt der aktuellen Forschung geraten, mit dem Ziel, den genauen Zusammenhang zwischen Adipositas und kardiovaskulären Erkrankungen zu erforschen.

Verschiedene einschlägige epidemiologische Studien konnten früh belegen, dass es eine enge Korrelation zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und Adipositas gibt. Bereits 1967 konnte in der Framingham-Studie gezeigt werden, dass ein erhöhtes Risiko für Angina pectoris und plötzlichen Herztod für adipöse Männer und Frauen besteht (Kannel *et al.*, 1967). Das gilt sowohl für Individuen, die an hohem Blutdruck und erhöhtem Serum-Cholesterin leiden, als auch für solche, die diesbezüglich nicht belastet sind. Bereits hier wurde postuliert, dass es einen von anderen Risikofaktoren unabhängigen Beitrag der Übergewichtigkeit für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen gibt (Kannel *et al.*, 1967).

In neuen Ergebnissen der Framingham-Studie konnte bewiesen werden, dass ein erhöhter BMI einen weitgehend unabhängigen Risikofaktor für Herzversagen darstellt (Kenchiah *et al.*, 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass bereits der Anstieg des BMI vom Normalwert (18,5-24,9) zu übergewichtigen Werten (25,0-29,9) mit einer Erhöhung des Risikos für ein kardiovaskuläres Ereignis um fünf Prozent bei Männern und sieben Prozent bei Frauen einhergeht. Übergewicht allein ist in elf Prozent der Fälle bei Männern und 14 Prozent der Fälle bei Frauen allein für Herzversagen



verantwortlich. Das kardiovaskuläre Risiko ist auch erhöht, wenn der Bauchumfang (Waist Circumference, WC) als Kriterium für abdominale Fettleibigkeit verwendet wird (Peiris *et al.*, 1989). Diese epidemiologischen Zahlen belegen den engen Zusammenhang von Übergewicht und kardiovaskulären Krankheiten. Über die zugrunde liegenden Mechanismen herrscht jedoch weitgehende Unklarheit.

## **2.2 Die arteriellen Blutgefäße**

Die essentielle Bluthochdruckkrankheit des Menschen geht mit einem erhöhten Blutdruck bei initial normalem Herzminutenvolumen einher (Mulvany *et al.*, 1976). Der totale periphere Widerstand (TPR) ist dabei erhöht. Alle Gefäße im menschlichen Körper nehmen an der Determination des TPR teil, jedoch ist der Anteil und die Bedeutung kleinerer Arterien und Arteriolen am Gesamtwiderstand größer (Mulvany *et al.*, 1976). Kleine Arterien und Arteriolen sind entscheidende Determinanten des Blutdrucks. Durch Kontraktion und Relaxation der arteriellen Blutgefäße wird der TPR und damit der Blutdruck reguliert. Schäden an den Blutgefäßen, wie zum Beispiel jene am Endothel im Rahmen der Atherosklerose und der endothelialen Dysfunktion, sind wichtige ätiopathologische Schritte auf dem Weg zu kardiovaskulären Erkrankungen. Daher konzentrieren sich seit Jahren intensive Forschungsbemühungen auf die einzelnen Schichten der Blutgefäße, um ihren pathophysiologischen Beitrag zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen zu klären (Drexler, 2000).

### **2.2.1 Das Endothel der Blutgefäße**

Das Endothel ist die innerste Schicht der Blutgefäße. Es ist auf der dem Lumen zugewandten Seite in direktem Kontakt mit der Blutströmung und auf der dem Lumen abgewandten Seite in unmittelbarem Kontakt mit der Gefäßmuskulatur. Das Endothel wurde lange Zeit lediglich als eine das Lumen auskleidende Schicht ohne Funktion angesehen. Die Entdeckung der endothelialen Vasodilatation änderte diese Sichtweise.

### 2.2.1.1 Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF)

1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki, dass das Endothel vasoaktive Substanzen produziert (Furchgott *et al.*, 1980). In Organbad-Experimenten an isolierten Gefäßringen konnten sie zeigen, dass für die Azetylcholin-abhängige Vasodilatation ein intaktes Endothel notwendig ist. Sie folgerten, dass die Endothelzellschicht der Blutgefäße einen Faktor produzieren muss, der relaxierend auf die Gefäßmuskelzellen wirkt und nannten ihn, ohne Kenntnis seiner molekularen Struktur Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF). Dieser Faktor konnte in der Folgezeit als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden (Vanheel *et al.*, 1994). Nach der Bestätigung der Ergebnisse in vivo an Tiermodellen, konnte schon 1986 das Prinzip der Regulation des Gefäßtonus durch das Endothel klinisch am Menschen getestet und betätigt werden (Ludmer *et al.*, 1986). Die Ergebnisse bestätigten, dass arteriosklerotische Gefäße nicht in der Lage sind, NO nach Stimulation durch Acetylcholin freizusetzen. In der weiteren Forschung wurde NO als ein Schutzfaktor der Arterie angesehen. Die Fähigkeit des Endothels NO zu produzieren hilft, die ischämischen Auswirkungen der Atherosklerose zu verhindern (Egashira *et al.*, 2002).

Mittlerweile ist die Substanz NO sehr gut untersucht. Besondere Bedeutung hat es vor allem in großen Gefäßen. Dort wird es als Antwort auf physikalische Stimuli, wie zum Beispiel eine vergrößerte Schubspannung oder durch rezeptorabhängige Agonisten, wie Bradykinin und Azetylcholin, freigesetzt. Die Wirkung von NO ist in vielen verschiedenen Gefäßen beschrieben worden. Seine relaxierende Wirkung ist zum Beispiel an der Mesenterialarterie der Ratte (Garland *et al.*, 1992) und an der Aorta der Ratte (Vanheel *et al.*, 1994) gezeigt worden.

Durch die oben genannten Stimuli erhöht sich die Kalziumkonzentration in der Endothelzelle. Die NO-Synthase wird aktiviert, die die Aminosäure L-Arginin zu NO und Citrullin umsetzt. NO aktiviert die Guanylatzyklase, die GTP zu cGMP umsetzt. Dadurch wird die Proteinkinase G aktiviert, die mit der Phosphorylierung von Proteinen über verschiedene Mechanismen, wie z.B. die Aktivierung von Ionenkanälen, der Reduktion der Kalziumsensitivität des kontraktile Systems, der Inhibierung des Inositriphosphatrezeptors, die globale intrazelluläre

Kalziumkonzentration in der glatten Muskelzelle senkt und damit eine Relaxation erzeugt (Carvajal *et al.*, 2000).

### **2.2.1.2 Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>)**

Das Endothel produziert außer NO noch eine Vielzahl anderer Substanzen, die relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur wirken und damit den TPR modulieren: Aus der Arachidonsäure wird über die Zykllooxygenase (COX) Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) gebildet. Prostazyklin führt über eine Konzentrationserhöhung von cAMP ebenfalls zu einer Relaxation von glatten Gefäßmuskelzellen. Das geschieht durch die Ausfuhr von Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) aus dem Zytosol und durch Verminderung der Kalziumsensitivität des kontraktile Systems und Aktivierung von Kaliumkanälen der Zellmembran. Es ist beschrieben worden, dass K<sub>ATP</sub>-Kanäle durch PGI<sub>2</sub> aktiviert werden. (Jackson *et al.*, 1993; Nakashima *et al.*, 1995; Parkington *et al.*, 1993).

### **2.2.1.3 Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)**

Im Laufe der Endothel-Forschung ist es zu der Beobachtung gekommen, dass die endothelbedingte Hyperpolarisation und nachfolgende Relaxation der Arterien nicht ausschließlich über NO und PGI<sub>2</sub> erklärt werden konnten (Cowan *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 2000). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein weiterer Faktor vom Endothel gebildet werden muss, der diese Wirkung vermittelt. Nach Hemmung der NO-Synthase (z.B. durch LNNA) und der COX (z.B. durch Indometacin) konnte weiterhin eine Dilatation erzeugt werden. Da die NO/PGI<sub>2</sub>-unabhängige Vasodilatation mit einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen verbunden war, wurde angenommen, dass ein weiterer Faktor der endothelabhängigen Vasodilatation existiert. Man gab ihm den Namen EDHF, Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (Busse, 2002; Campbell, 1996; Quilley, 1997).

EDHF verursacht eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen, aus der eine Vasodilatation durch Inhibition von spannungsabhängigen Kalziumkanälen (Nagao *et al.*, 1992) resultiert. Diese Veränderung des Membranpotentials muss durch eine

Veränderung des Kalium-Flusses zustande kommen, da ein Anheben der Kaliumkonzentration auf 25-40 mM oder die Inhibition spezifischer Kaliumkanäle, wie BK- und SK-Kanäle, die EDHF-Wirkungen blockiert (Dora *et al.*, 2001; Nagao *et al.*, 1992).

Als Kandidaten für EDHF gelten Epoxide der Arachidonsäure (Adeagbo *et al.*, 1993; Cowan *et al.*, 1991; Mombouli *et al.*, 1997). Über das Zytochrom-P-450-System (CYP 450) findet im Endothel die Umwandlung der Arachidonsäure in kurzlebige Epoxide statt: Epoxyeikosatriensäure (EET) (Campbell *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1999; Quilley *et al.*, 2000; Quilley *et al.*, 1997). Verschiedene EETs mit unterschiedlichen Wirkungen an unterschiedlichen Blutgefäßen konnten identifiziert werden, wie 5,6-, 8,9-, 11,12-, 14,15-EET und auch Hydroxyeikosatetraensäuren wie 20- und 19-HETE. Für Koronararterien des Schweins wurde nachgewiesen, dass 14,15 EET eine Vasorelaxation durch Öffnung von  $K_{Ca}^{2+}$ -Kanälen bewirkt (Campbell *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2002; Lauterbach *et al.*, 2002). Lauterbach *et al.* zeigten an Zerebralarterien der Ratte, dass auch die Epoxyeikosatetraensäure 17,18-EETeTR, ein Epoxid der Eikosapentaensäure (EPA), zu einer Aktivierung von BK-Kanälen führt (Lauterbach *et al.*, 2002).

## Endothelium

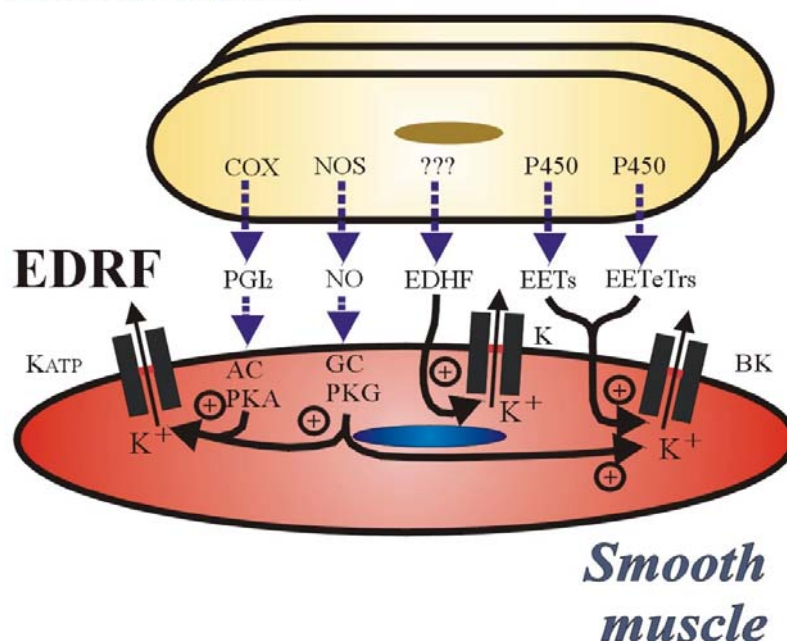


Abb. 2.1: Einfluss des Endothels auf die glatte Gefäßmuskulatur. Modell der endothelabhängigen Vasodilatation. Die Endothelzelle produziert über die

Zyklooxygenase Prostaglandine, z.B.  $\text{PGI}_2$  und über die NO-Synthase NO. Durch Aktivierung der Adenylatzyklase und Guanylatzyklase in der glatten Gefäßmuskelzelle kommt es zur Aktivierung von Proteinkinasen, PKA und PKG, wodurch Kaliumkanäle, wie  $\text{K}_{\text{ATP}}$ - und BK-Kanäle, geöffnet werden. Außerdem existiert ein weiterer Faktor der endothelabhängigen Vasodilatation: EDHF. Als Kandidaten für diesen noch nicht einheitlich identifizierten Faktor gelten Epoxyeikosatriensäuren (EETs) und Epoxyeikosatetraensäuren (EETeTRs), die über das Zytochrom-P-450-System der Endothelzelle gebildet werden. Zielstruktur in der glatten Gefäßmuskelzelle sind ebenfalls Kaliumkanäle, wie BK-Kanäle. Die Öffnung von Kaliumkanälen führt zu verstärktem Kaliumausstrom, zu Hyperpolarisation der Zellmembran und zur Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle.

## **2.2.2 Die Media der Blutgefäße**

### **2.2.2.1 Glatte Gefäßmuskelzellen**

Die glatten Gefäßmuskelzellen der kontraktiven Schicht der Blutgefäße, der Media, regulieren durch Kontraktion und Dilatation die Weite des Gefäßlumens und damit den Strömungswiderstand des Blutes. Eine wichtige Funktion haben hierbei die Kaliumkanäle der Zellmembran, die das Membranpotential der arteriellen glatten Muskelzellen regulieren (Nelson *et al.*, 1995). Das Öffnen der  $\text{K}^+$ -Kanäle in der Zellmembran erhöht den  $\text{K}^+$ -Ausstrom, wodurch das Membranpotential hyperpolarisiert wird. Das führt zum Schließen spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, zu einem geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Gefäßmuskelzelle und damit zu Vasodilatation. Viele endogene Vasodilatoren wirken über die Aktivierung von Kaliumkanälen. Die Inhibierung von Kaliumkanälen verursacht Membrandepolarisation, die zu Vasokonstriktion führt (Nelson *et al.*, 1995).

### **2.2.2.2 Die Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskelzelle**

Vier Gruppen von  $\text{K}^+$ -Kanälen wurden bisher im glatten Muskel identifiziert (Nelson *et al.*, 1995):

- 2.2.2.2.1 ATP-abhängige  $K^+$  ( $K_{ATP}$ )-Kanäle
- 2.2.2.2.2 Einwärtsgerichtete  $K^+$  ( $K_{ir}$ )-Kanäle
- 2.2.2.2.3  $Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$  ( $K_{Ca^{2+}}$ )-Kanäle
- 2.2.2.2.4 Spannungsabhängige  $K^+$  ( $K_V$ )-Kanäle

#### 2.2.2.2.1 $K_{ATP}$ -Kanäle

$K_{ATP}$ -Kanäle, die zuerst am Herzen entdeckt wurden (Noma *et al.*, 1983), finden sich in einer Vielzahl von Geweben, wie zum Beispiel der  $\beta$ -Zelle des Pankreas und bestimmten Neuronen (Ashcroft *et al.*, 1990). Sie sind auch in der glatten Gefäßmuskulatur von Aorta und der Mesenterialarterie lokalisiert (Quayle *et al.*, 1994). Diese Kanäle zeichnen sich dadurch aus, dass sie durch intrazelluläres ATP geschlossen werden (Nelson *et al.*, 1995). Damit haben sie eine wichtige Aufgabe im zellulären Stoffwechsel. Außerdem werden sie durch eine Reihe endogener Vasodilatoren aktiviert. Die resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran verursacht Vasodilatation (Nelson *et al.*, 1995).

$K_{ATP}$ -Kanäle sind in unterschiedlichen Geweben verschiedenartig exprimiert. Ein  $K_{ATP}$ -Kanal setzt sich zusammen aus einer Kir6.x-Untereinheit (Kir 6.1 oder Kir 6.2) und einem Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Subtyp, SUR1 oder SUR2 (Wang, 2003). Die Kir6.x-Untereinheit bildet die Pore des Kanals, während die SUR-Region die regulatorische Untereinheit darstellt. Die physiologischen Eigenschaften eines  $K_{ATP}$ -Kanals sind abhängig von der Zusammensetzung dieser Untereinheiten.

Verschiedene endogene Vasodilatoren wirken über eine Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen. Adenosin ist ein potenter Vasodilatator von Koronararterien. Es aktiviert  $K_{ATP}$ -Ströme in Koronararterien via A1-Rezeptor (Dart *et al.*, 1993). Ein weiterer endogener Vasodilatator, der  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiviert, ist Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP). Es aktiviert den Kanal über den Adenylatcyclase-Proteinkinase-A-Weg (Quayle *et al.*, 1994). Das legt nahe, dass auch andere endogene Vasodilatoren über diesen Signaltransduktionsweg wirken könnten.

Ein selektiver  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker ist Glibenclamid (halbmaximaler Block 20-100 nM, keine Antagonisierung anderer Kalium-Kanäle bei 10  $\mu$ M)(Nelson *et al.*, 1995).

Tetrapenthyllammonium (TPeA) ist in der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ebenfalls ein  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Blocker (Kovacs *et al.*, 1991), blockt jedoch in der Konzentration von 1,49 mM ( $\text{EC}_{50}$ ) auch BK-Kanäle (Yao *et al.*, 2000). Cromakalim (100 nM) ist ein Öffner des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals (Nelson *et al.*, 1995).

#### 2.2.2.2.2 $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle

$\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle sind in sehr kleinen Gefäßen des mesenterialen, koronaren und zerebralen Stromgebiets der Größe 200  $\mu\text{m}$  nachgewiesen worden (Edwards *et al.*, 1988; Hirst *et al.*, 1986; Quayle *et al.*, 1993).

Sie sind einwärts rektifizierend und leiten einwärts gerichtete Strömungen bei Membranpotentialen negativ zum Kalium-Gleichgewichtspotential (EK) in größerem Maße als kleinere auswärts gerichtete Strömungen bei Membranpotentialen positiv zu EK (Nelson *et al.*, 1995).

Die  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle, die bis jetzt in arteriellen glatten Muskelzellen identifiziert wurden, gehören zur  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Subfamilie  $\text{K}_{\text{ir}}2$  (Bradley *et al.*, 1999).  $\text{K}_{\text{ir}}$ -Ströme in isolierten Glattemuskelzellen von zerebralen, koronaren und mesenterialen Arterien der Ratte scheinen beispielsweise durch  $\text{Kir}2.1$ , aber nicht  $\text{Kir}2.2$  und  $\text{Kir}2.3$ , vermittelt zu sein (Zaritsky *et al.*, 2000). Molekulare Untersuchungen zeigten, dass in Mesenterialarterien der Ratte nur  $\text{K}_{\text{ir}}2.1$  exprimiert wird (Bradley *et al.*, 1999; Dora *et al.*, 2001).

$\text{K}_{\text{ir}}$ -Kanäle werden durch Barium-Ionen ( $\text{Ba}^{2+}$ ) in der Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  halbmaximal blockiert (Nelson *et al.*, 1995).

#### 2.2.2.2.3 $\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$ -Kanäle

Die  $\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$ -Kanäle bilden eine heterogene Familie, deren Vertreter in drei Klassen eingeteilt werden:  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$ )-Kanäle großer- (BK), mittlerer- (IK), und kleiner- (SK) Leitfähigkeit.  $\text{K}_{\text{Ca}}^{2+}$ -Kanäle finden sich in nahezu allen glatten Gefäßmuskelzellen und erfüllen dort vielfältige Aufgaben (Nelson *et al.*, 1990).

In glatten Gefäßmuskelzellen werden  $K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle großer Leitfähigkeit (BK) in der Zellmembran durch lokal begrenzte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Freisetzung, genannt  $Ca^{2+}$ -Sparks, durch die Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren aktiviert (Gollasch *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1995).  $Ca^{2+}$ -Sparks führen zu Hyperpolarisation der Zellmembran, reduziertem  $Ca^{2+}$ -Influx in die Zelle und damit zu Vasodilatation (Gollasch *et al.*, 2000). Der BK-Kanal ist aus zwei Untereinheiten aufgebaut,  $\alpha$ - und  $\beta 1$ -Untereinheit. In Experimenten mit BK $\beta 1$ -knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die  $\beta 1$ -Untereinheit für die Feineinstellung der Eigenschaften des BK-Kanals für die Anforderungen der VSMC entscheidend ist (Brenner *et al.*, 2000; Plüger *et al.*, 2000). So spielt die BK $\beta 1$ -Untereinheit eine entscheidende Rolle in der Regulation des menschlichen Baroreflexes und damit der Blutdruckregulation (Gollasch *et al.*, 2002).

BK-Kanäle werden durch die Skorpiontoxine Charybdotoxin (halbmaximaler Block bei 1-10 nM) und Iberiotoxin (halbmaximaler Block bei 1-10 nM), sowie durch Tetrapentylammonium (TEA) blockiert (halbmaximaler Block bei 1 mM) (Nelson *et al.*, 1995). Charybdotoxin und Iberiotoxin blocken weder  $K_V$ ,  $K_{ATP}$  noch  $K_{ir}$ , während TEA als unspezifischer Kaliumkanalblocker in einer  $EC_{50}$ -Konzentration von 10mM auch  $K_V$ -Kanäle blockiert, in der Konzentration von 1 mM aber weder  $K_{ATP}$  noch  $K_{ir}$  (Nelson *et al.*, 1995). BK-Kanäle sind im glatten Gefäßmuskel, nicht jedoch im Endothel der Blutgefäße, exprimiert (Mistry *et al.*, 1998).

$K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit (IK-Kanäle) sind nicht in der glatten Gefäßmuskelzelle selbst lokalisiert, sondern im Endothel der Gefäßmuskulatur (Crane *et al.*, 2003; Doughty *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2001). Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der endothelabhängigen Vasodilatation. Die Aktivierung der IK-Kanäle führt zur Hyperpolarisation der Endothelzelle und nachfolgender Hyperpolarisation und Relaxation der vaskulären Glattmuskelzelle. Die Wirkung von EDHF geschieht auf diesem Weg (Busse *et al.*, 2002). Die IK-Kanäle werden von Charybdotoxin (1-10nM) geblockt (Dora *et al.*, 2001).

$K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle kleiner Leitfähigkeit (SK-Kanäle) sind sowohl in der Endothelzelle (Crane *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 1998) als auch in der glatten Muskelzelle der Blutgefäße präsent (Gauthier *et al.*, 2004). Die Kanäle werden typischerweise von



Apamin geblockt ( $EC_{50}$ , 1  $\mu$ M). Deren Öffnungswahrscheinlichkeit ist nicht spannungsabhängig (Kohler *et al.*, 1996). SK-Kanäle sind vielfältig in die Prozesse der endothelabhängigen Vasodilatation involviert (Crane *et al.*, 2003). Verschiedene Autoren belegen die Beteiligung des Apamin-sensitiven Kanals an der NO-Wirkung (Murphy *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2001).

#### 2.2.2.2.4 $K_V$ -Kanäle

$K_V$ -Kanäle bilden verschiedene Unterfamilien. Einige von ihnen sind in glatten Muskelzellen nachgewiesen worden (Clement-Chomienne *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 1996), wie zum Beispiel in menschlichen Mesenterialgefäßen (Smirnov *et al.*, 1992).  $K_V$ -Kanäle bestehen, wie auch die  $K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle, aus einer porenbildenden  $\alpha$ - und einer modulatorischen  $\beta$ -Untereinheit (Thorneloe, 2001). Ein  $K_V$ -Kanal setzt sich aus vier porenbildenden  $K_{V\alpha}$ -Untereinheiten und vier regulatorischen  $K_{V\beta}$ -Untereinheiten zusammen.  $K_{V\alpha}$  Proteine werden von neun verwandten Familien enkodiert,  $K_{V1-9}$ .  $K_{V1-4}$ . Diese Proteine formen homotetramere Kanäle oder vereinigen sich mit Mitgliedern der selben Familie zu heterotetrameren Kanälen (Martens *et al.*, 1999). Zusätzliche Verschiedenheit wird erreicht, wenn sich  $K_{V1\alpha}$ -Untereinheiten mit verschiedenen  $K_{V\beta}$ -Untereinheiten zusammenlagern. Für  $K_{V\beta}$ -Proteine kodieren 4 Gene,  $K_{V\beta1-4}$  wobei Splice-Varianten von  $K_{V\beta1}$  und  $K_{V\beta2}$  identifiziert worden sind (Accili *et al.*, 1997; Heinemann *et al.*, 1996; Rhodes *et al.*, 1997; Trimmer *et al.*, 1998).

$K_V$ -Kanäle werden geöffnet, wenn das Membranpotential der Zelle depolarisiert wird (Hille *et al.*, 1992; Knot *et al.*, 1995). Der Kaliumausfluss durch  $K_V$ -Kanäle erhöht sich mit der Depolarisation auf Grund der spannungsabhängigen Aktivierung. Der elektrochemische Gradient für den  $K^+$ -Ausfluss aus der Zelle nimmt zu. Auf diese Weise verhindern sie eine weitere Depolarisation. Nach der Depolarisation werden sie inaktiviert. Die Aktivität des 4-AP-sensitiven  $K_V$ -Kanals wird von Agonisten beeinflusst, die über den Signaltransduktionsweg der Proteinkinase A und C wirken (Waldron *et al.*, 1999).

Der selektivste  $K_V$ -Kanal-Blocker im glatten Gefäßmuskel ist 4-AP (halbmaximaler Block bei 1 mM) (Robertson *et al.*, 1994). 4-AP blockt weder  $K_{ir}$ - noch  $K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Konzentration, in der es  $K_V$ -Kanäle inhibiert, während es  $K_{ATP}$ -Kanäle bei einer

EC<sub>50</sub>-Konzentration von 0,2 mM blockt (Nelson *et al.*, 1995). Auch andere Stoffe, wie 3,4-Diaminopyridin inhibieren K<sub>V</sub>-Kanäle effektiv (halbmaximaler Block bei 1 mM) (Jaggar *et al.*, 1998a).

### **2.2.2.3 Intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle**

Eine wichtige Rolle für die Weiterleitung der Informationen extrazellulär zirkulierender Botenstoffe an intrazelluläre Effektoren spielen intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle. Hierbei wird ein extrazellulärer Stimulus über die rezeptorgebundene Aktivierung von G-Proteinen und subsequente Aktivierung von Proteinkinasen weitergeleitet. In VSMC sind Proteinkinase A, G und Tyrosinkinase wichtige intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle, die verschiedenste Antworten der Zelle, so auch kontraktile Antworten modulieren können (Jaggar *et al.*, 1998b; Muller *et al.*, 1996). In Adipozyten sind intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle ebenfalls an der Weiterleitung hormonaler Informationen beteiligt. (Anderson *et al.*, 1993; Fredriksson *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1999; Lindquist *et al.*, 2000; Sordella *et al.*, 2003).

#### **2.2.2.3.1 Proteinkinase A (PKA)**

Das intrazelluläre Signaltransduktionsmolekül PKA spielt eine wichtige Rolle in vaskulären glatten Muskelzellen (Jaggar *et al.*, 1998b; Muller *et al.*, 1996). Für die glatte Gefäßmuskulatur konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase A sich in kleinen Arterien, die einen myogenen Tonus aufbauen, in aktiviertem Zustand befindet (Schubert *et al.*, 1999). Selektive Inhibition der Proteinkinase A durch H-89 resultierte in einer Kontraktion des untersuchten Gefäßes, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die PKA an der Aufrechterhaltung des myogenen Tonus beteiligt ist. Der Effekt der PKA wird teilweise auf die Aktivierung von BK-Kanälen zurückgeführt (Schubert *et al.*, 1999). Auch für die Wirkung der endogenen Vasodilatoren Adenosin und CGRP ist die Aktivierung der Proteinkinase A von Bedeutung. Adenosin, das eine bedeutende Rolle in der hypoxischen Vasodilatation

und ischämieinduzierten Hyperämie spielt, scheint zum Teil über eine Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen zu wirken (Kleppisch *et al.*, 1995b).

In Adipozyten spielt der  $\beta$ -adrenerge Weg der PKA-Aktivierung ebenfalls eine wichtige Rolle für verschiedenste zelluläre Funktionen. Die Rezeptoren des adrenergen Systems sind in Adipozyten exprimiert (Klein *et al.*, 1999). Auch hier findet man den „klassischen“ Weg der PKA-Aktivierung von  $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung,  $G_s$ - und Adenylatzyklasten-Aktivierung, Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und schließlich Aktivierung der PKA. Für die  $\beta_3$ -adrenerge Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in braunen Adipozyten ist eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von Bedeutung (Lindquist *et al.*, 2000). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression des potenten angiogenetischen Faktor VEGF in Primärkulturen brauner Adipozyten der Ratte durch PKA vermittelt wird (Fredriksson *et al.*, 2000).

#### **2.2.2.3.2 Tyrosinkinase (TK)**

Der Signaltransduktionsmechanismus der Tyrosinkinase ist sowohl am glatten Muskel (Murphy *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2001; Spurrell *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2002), als auch in Adipozyten (Fredriksson *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1999; Lindquist *et al.*, 2000; Sordella *et al.*, 2003) von Bedeutung. Die Tyrosinphosphorylierung ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus für die Zellfunktion. Das gilt nicht nur für wachstumsbezogene Antworten der Zelle, wie Gentranskription und Zellteilung, sondern auch für schnelle zelluläre Antworten, wie Muskelkontraktion (Spurrell *et al.*, 2000).

In der glatten Muskulatur ist für Kalziumkanäle eine Beteiligung der Tyrosinkinase nachgewiesen worden. Die Blockade der Tyrosinkinase durch Genistein und Tyrphostin, aber nicht durch Daidzein reduzierte die Aktivität der L-Typ-Kalzium-Kanäle. Diese Kanäle scheinen teilweise über Tyrosinkinase reguliert zu werden (Keef *et al.*, 2001). In der  $\alpha_1$ -adrenergen Vasokonstriktion spielt die Signaltransduktion über Tyrosinkinase ebenfalls eine Rolle (Yan *et al.*, 2002).

In Adipozyten besitzt die Tyrosinkinase vielfältige Funktionen. Die Tyrosinphosphorylierung durch Tyrosinkinase ist in die insulinabhängige Glukoseaufnahme in Fettzellen involviert (Klein *et al.*, 1999). Hier konnte auch eine Interaktion mit adrenergen, PKA-abhängigen Mechanismen festgestellt werden (Klein *et al.*, 1999).

#### **2.2.2.3.3 Proteinkinase G (PKG)**

Im glatten Gefäßmuskel fungiert PKG als Vermittler vasorelaxierender Effekte, so in der Wirkungskausalität von Stickstoffmonoxid (NO). Das NO aktiviert die Guanylatzyklase, die GTP zu cGMP umsetzt. Dadurch wird Proteinkinase G aktiviert, die dann die NO-Wirkung über verschiedene Mechanismen vermittelt (Cohen *et al.*, 1995). Durch die aktivierte PKG werden verschiedene Zielproteine phosphoryliert, darunter kalziumkontrollierende Enzyme, Ionenpumpen und Ionenkanäle (Carvajal *et al.*, 2000). Die Aktivierung des BK-Kanals durch die cGMP-abhängige Proteinkinase spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der NO-Wirkung am glatten Gefäßmuskel (Robertson *et al.*, 1993).

### **2.2.3 Die Adventitia und das perivaskuläre Fettgewebe**

Die Adventitia umschließt die Blutgefäße nach außen. Sie ist zwischen der Gefäßmuskulatur und den umgebenden Organen und Strukturen gelegen und dient als Stützschicht für die Blutgefäße. Sie besteht aus Zellen, vor allem Fibroblasten, Bindegewebe, elastischen Fasern und Fettzellen und ist stark innerviert (Guterman *et al.*, 1999).

#### **2.2.3.1 Arten des perivaskulären Fettgewebes**

Man kann Fettgewebe in braunes und weißes Fett unterteilen. Beides hat unterschiedliche Aufgaben und Baupläne. Braunes Fettgewebe kommt beim Menschen nahezu ausschließlich beim Säugling vor. Es hat hier vor allem

temperaturschützende Aufgaben und verschwindet fast vollständig beim Erwachsenen. In Ratten gibt es auch bei erwachsenen Tieren unterschiedliche Anteile braunen und weißen Fettgewebes (Cinti *et al.*, 2000).

### **2.2.3.2 Fettgewebe: Eigenschaft und Funktion**

Unterschiedliche Studien haben nachgewiesen, dass das Fettgewebe ein endokrin aktives, sekretorisches Organ ist. Es sezerniert eine Vielzahl von Substanzen, die das innere Milieu des Körpers beeinflussen (Engeli *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2001). Verschiedene Vertreter des Angiotensinsystems, wie Angiotensinogen, Angiotensin-Converting-Enzyme und Angiotensin-Rezeptoren wurden im Fettgewebe identifiziert (Cassis *et al.*, 1988; Engeli *et al.*, 2002; Engeli *et al.*, 2001). Die Stimulierung der Angiotensin-I- und Angiotensin-II-Rezeptoren in Adipozyten lösen eine Freisetzung von Prostazyklin aus Adipozyten aus (Darimont *et al.*, 1994).

Fettgewebe ist eine Produktionsstätte für Prostaglandine. Vorherrschend finden sich PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>, die beide potente Vasodilatoren sind. In situ Studien mit Mikrodialysetechnik im Fettgewebe der Ratten zeigten, dass Prostaglandine eine große Rolle betreffs des lokalen Metabolismus spielen, da das Fettgewebe außerdem hormonell reguliert ist (Crandall *et al.*, 1997).

Zwei weitere Substanzen, denen kürzlich in der Forschung viel Aufmerksamkeit geschenkt wurde, sind Leptin und Adiponektin. Sie eröffnen interessante Perspektiven in der Rolle des Fettgewebes für das Gefäßsystem.

Leptin wird hauptsächlich vom weißen Fettgewebe produziert (Kimura *et al.*, 2000). Die Produktion ist bei Übergewichtigen erhöht (Considine *et al.*, 1996). Jüngere Untersuchungen zeigten, dass Leptin eine signifikante Rolle in der Pathogenese des Adipositas-bezogenen Bluthochdrucks spielen kann (Engeli *et al.*, 2000). In einer anderen Studie konnte demonstriert werden, dass Leptin auch vasodilatierende Wirkungen auf die Mesenterialarterie der Ratte hat. In den in vitro Experimenten relaxierte das Leptin die Gefäßringpräparationen dosisabhängig (Kimura *et al.*, 2000). Die Vasorelaxation durch Leptin war endothelabhängig und durch NO vermittelt.

Adiponektin ist ein in Adipozyten produziertes Hormon. Es hat primäre Aufgaben in der Energiehomöostase und im Insulin-Metabolismus (Zhang *et al.*, 2002). Die Expression und daraus resultierende Serumspiegel von Adiponektin sind bei Menschen und Tieren mit Insulin-Resistenz und Übergewicht erniedrigt (Arita *et al.*, 1999). In Untersuchungen an Adiponektin-knockout-Mäusen, sowie klinischen Untersuchungen, konnte darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen Hypoadiponektämie und endothelialer Dysfunktion hergestellt werden. Bei hypertensiven, übergewichtigen Patienten bestand eine signifikante Korrelation zwischen erniedrigten Adiponektin-Serumspiegeln und einer beeinträchtigten endothelabhängigen Vasorelaxation (Ouchi *et al.*, 2003).

### **2.3 Die Entdeckung des Adventitium-Derived Relaxing Factor (ADRF)**

1991 hat die Arbeitsgruppe um Lisa Cassis zeigen können, dass perivaskuläres Fettgewebe die Gefäßspannung der Aorta im in vitro Experiment beeinflusst (Soltis *et al.*, 1991). Gefäßringpräparationen wurden dabei in einen Myographen eingespannt und isometrische Kontraktionsmessungen durchgeführt. Die Gruppe um Cassis entdeckte, dass das periadventitielle Fettgewebe der Aorta eine antikontraktile Wirkung auf durch Norepinephrin kontrahierte Aorta-Segmente der Ratte hatte. Durch elektrische Feldreizung induzierte Kontraktionen des Gefäßmuskels wurden durch das die Blutgefäße umgebende perivaskuläre Fettgewebe gehemmt. Es wurden gleiche kontraktile Antworten auf hohe Molaritäten KCl bei den Präparaten (+)fat und (-)fat gefunden. Der beobachtete antikontraktile Effekt des periadventitiellen Fettgewebes in vitro wurde über eine verstärkte Wiederaufnahme von Norepinephrin in die sympathischen Nervendigungen und eine dadurch abgeschwächte Wirkung des sympathisch-adrenergen Nervensystems gedeutet (Soltis *et al.*, 1991).

Im Jahre 2002 ist die Idee von Soltis *et al.* erneut aufgegriffen worden. Man untersuchte die Wirkung des perivaskulären Fettgewebes auf die Gefäßkontraktion am Modell der thorakalen Aorta der Ratte. Lohn *et al.* wählten einen Versuchsansatz mit zwei Gruppen von Gefäßringpräparationen. In der einen Gruppe wurde das

periadventitielle Fettgewebe nicht entfernt, die Gefäßringe blieben in intaktem Zustand [Gefäßringe (+)fat]. In der anderen Gruppe entfernte man das die Gefäße umgebende Fettgewebe [Gefäßringe (-)fat] (Löhn et al., 2002).

In den isometrischen Kontraktionsmessungen zeigte sich, dass die Gefäßringe (+)fat eine abgeschwächte kontraktile Antwort auf vasokontrahierende Agonisten haben (Löhn et al., 2002). Durch mechanisches Entfernen des Endothels, sowie den Einsatz von Antagonisten der endothelabhängigen Vasodilatation (Inhibition des NO-Systems durch N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin, LNNA, 300 µM, der COX, Indometazin, 300 µM, sowie des Zytochrom-P-450-Systems durch 17-ODYA, 10 nM) konnte die Beteiligung des Endothels an dem beobachteten antikontraktilen Effekt ausgeschlossen werden. Durch Einsatz von Kaliumkanalantagonisten wurde nachgewiesen, dass bei Blockade von glattmuskulären Kaliumkanälen (v.a. Blockade von K<sub>ATP</sub>-Kanälen mit Glibenclamid, 3 µM) die antikontraktile Wirkung aufgehoben werden konnte (Löhn et al., 2002).

Durch Bioassay-Experimente wurde nachgewiesen, dass das perivaskuläre Fettgewebe einen humoralen, transferablen Faktor sezerniert, der antikontraktil auf die Muskulatur der Aorta wirkt (Löhn et al., 2002). Der Faktor wurde Adventitium-Derived Relaxing Factor (ADRF) genannt. **Abbildung 2.2** zeigt eine Modellvorstellung einer dualen Regulation des Gefäßwiderstandes durch Endothel und periadventitielles Fettgewebe unter Einbeziehung der von Löhn et. al. gewonnenen Erkenntnisse (Löhn et al., 2002).

## Endothelium

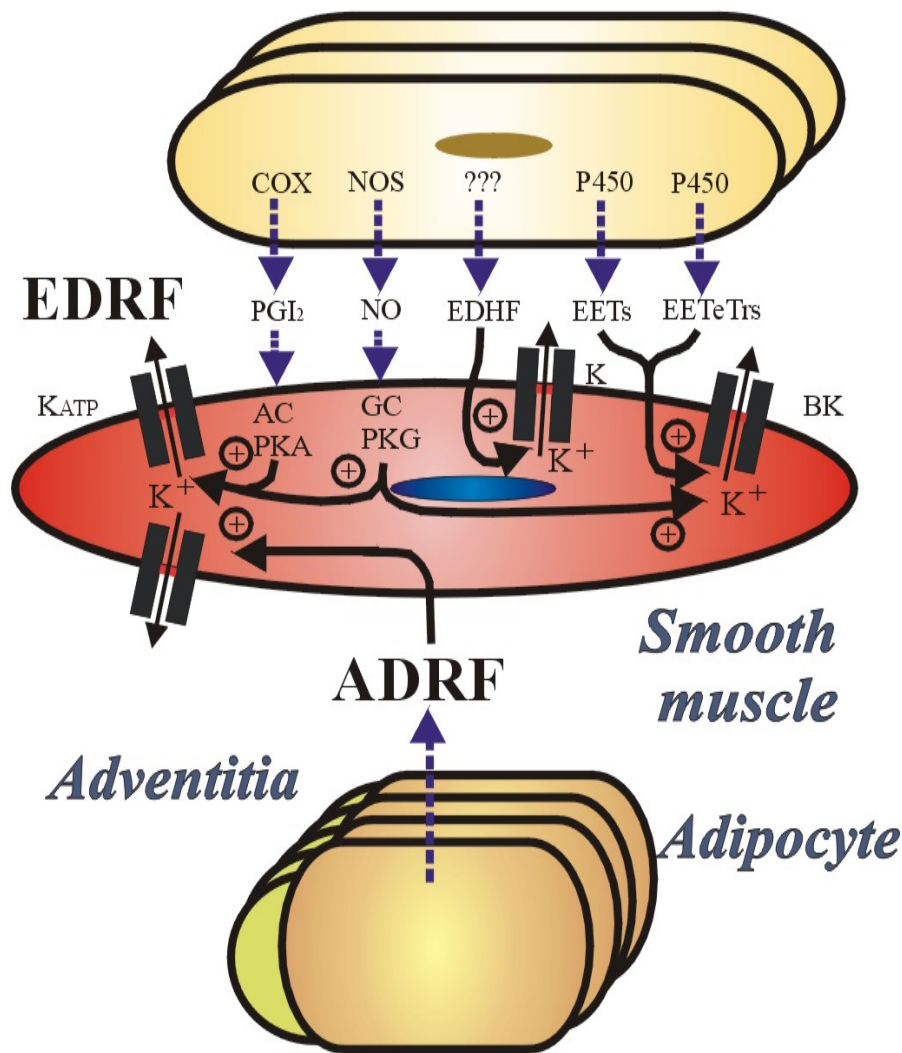


Abb. 2.2.: Modell der dualen Regulation des Gefäßtonus durch Endothel und Adventitia/perivaskuläres Fettgewebe. Zusätzlich zu den Mechanismen der endothelabhängigen Vasodilatation (Siehe Abb. 2.1) wird ein humoraler, transferabler Faktor aus der Adventitia bzw. dem periadventitiellen Fettgewebe freigesetzt: Adventitium-Derived Relaxing Factor (ADRF). Seine Wirkungsweise besteht vermutlich in der Öffnung von glattmuskulären Kaliumkanälen, der Hyperpolarisation der Zellmembran und daraus resultierender Relaxation der Gefäßmuskelzelle.



## 2.4 Hypothese und Herleitung der Aufgabenstellung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollen zelluläre Mechanismen der Freisetzung von ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe der Aorta untersucht werden. Nachdem in vorangehenden Studien beschrieben wurde, dass die antikontraktile Wirkung durch einen eigenständigen, transferablen Faktor vermittelt wird, sollen nun die näheren Bedingungen der Freisetzung und Wirkung erörtert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll gezeigt werden, ob und inwieweit das periadventitielle Fettgewebe einen antikontraktilen Effekt auf die Mesenterialarterie der Ratte ausübt. Ihre anatomischen Nähe zu Widerstandsarterien und die daraus erwachsene größere Bedeutung für die Regulation des Gesamt-Gefäßwiderstands ist dabei von Interesse. Des weiteren soll überprüft werden, ob auch hierbei Kaliumkanäle eine Rolle spielen.

**Im Einzelnen wird folgenden Hypothesen nachgegangen:**

### Teil I:

Welche zelluläre Mechanismen liegen der Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Rattenaorta zugrunde?

- Teilhypotesen:**
1. Ist die Freisetzung von ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe der Aorta kalziumabhängig?
  2. Ist der antikontraktile Effekt von ADRF reversibel, der Faktor auswaschbar?
  3. Welche Rolle spielen PKA, PKG und TK bei der Freisetzung und Wirkung von ADRF?

### Teil II:

Übt das periadventitielle Fettgewebe des Durchblutungsgebiets der Mesenterialarterie einen antikontraktilen Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur der Mesenterialarterie der Ratte aus?

- Teilhypothesen:**
1. Gibt es unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehungen auf vasoaktive Hormone bei Gefäßringen (+)fat und (-)fat?
  2. Welche Rolle spielen Kaliumkanäle bei der antikontraktilen Wirkung des perivaskulären Fettgewebes in der Mesenterialarterie?
  3. Welcher glattmuskuläre Kaliumkanaltyp ist möglicherweise an der Vermittlung des antikontraktilen Effekts des perivaskulären Fettgewebes in der Mesenterialarterie beteiligt?

### **3            *Material und Methoden***

#### **3.1            Versuchstiere**

Es wurden Aorten und Mesenterialarterien männlicher Sprague-Dawley-Ratten (Gewicht: 200-300g, Alter ca. 8 Wochen) verwendet. Die Haltung der Versuchstiere entsprach Standardlaborbedingungen: Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchtigkeit 40-50%, 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere wurden mit Pressfutter und Wasser ernährt, entsprechend der Standardlaborbedingungen im MDC-Tierhaus.

#### **3.2            Präparation der Untersuchungsgefäße**

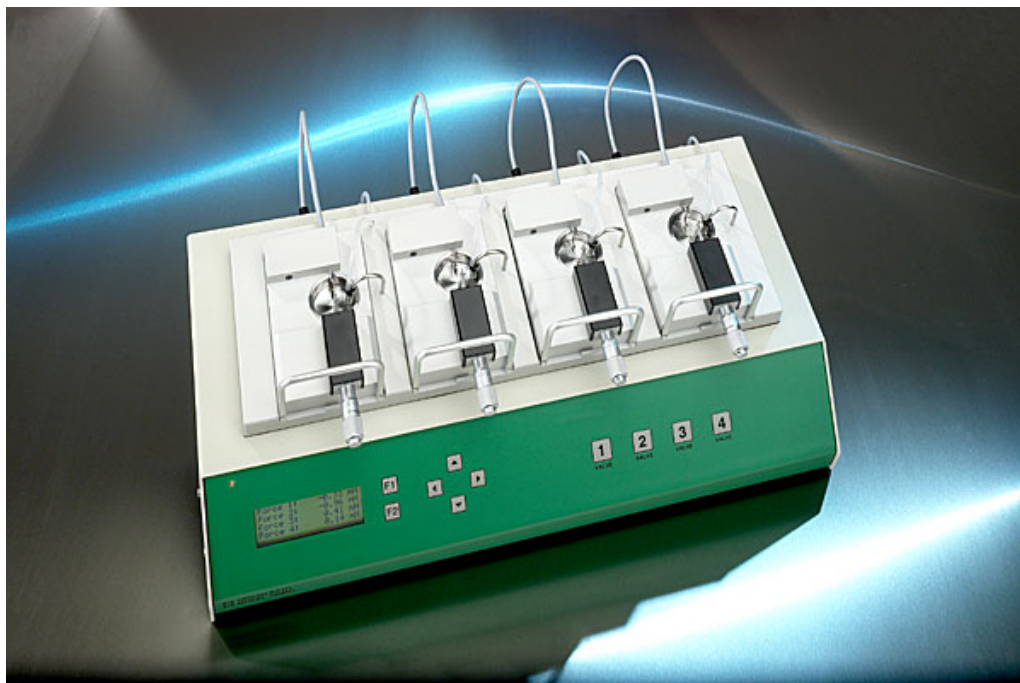
##### **3.2.1          Präparation der Mesenterialarterie**

Die Versuchstiere wurden mit Diethylether betäubt und mit einem Dekapitator (TSE, Bad Homburg) getötet. Die Bauchdecke wurde geöffnet, das Colon transversum dargestellt und durchtrennt. Das Mesenterium mit den Mesenterialarkaden wurde am Übergang des Jejunums zum Zökum durchschnitten und aufsteigend vom Zökum bis zum Abgang der A. mesenterica superior aus der Aorta vom Darm abgesetzt. Die Mesenterialarterie wurde am Abgang aus der Aorta abgetrennt. Das Präparat wurde schnell in eisgekühlte (4°C), begaste (95% O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>) PSS-Lösung (in mM: 119 Natriumchlorid, 4,7 Kaliumchlorid, 1,2 Kaliumdihydrogenphosphat, 25 Natriumhydrogenkarbonat, 1,2 Magnesiumsulfat, 11,1 Glukose, 1,6 Kalziumchlorid) transferiert und sofort präpariert.

Das entnommene Präparat wurde in eine Petrischale transferiert, die ebenfalls eisgekühlte und begaste PSS enthielt, und an beiden Seiten mit dünnen Nadeln auf dem Agarosebett befestigt. Unter einem Mikroskop (Nikon SMZ 645) wurden zwei verschiedene Präparationen angefertigt. Die Mesenterialarterie wurde dargestellt und in vier gleich große Stücke geschnitten, die jeweils dem Teil der Arterie kurz vor

Übergang in den 2. Abschnitt der Mesenterialarkaden entsprachen. Bei zwei der vier Stücke wurde vorsichtig das sie umgebende periaventitielle Fettgewebe entfernt, während es bei den anderen beiden Stücken intakt gelassen wurde. Die Gefäße (-)fat hatten einen äußeren Durchmesser von  $\sim 950 \mu\text{m}$ , entsprechend einem inneren Durchmesser von  $\sim 650 \mu\text{m}$ . Die belassene Menge des Fetts entsprach ungefähr dem doppelten Durchmesser des Gefäßlumens, die Ringe (+)fat hatten damit einen äußeren Gefäßdurchmesser von  $\sim 1200 - 1700 \mu\text{m}$ . Für bestimmte Experimente (Siehe Abschnitt 4.2.2) wurde 50% des die Mesenterialarterie umgebenden Fettgewebes longitudinal entfernt.

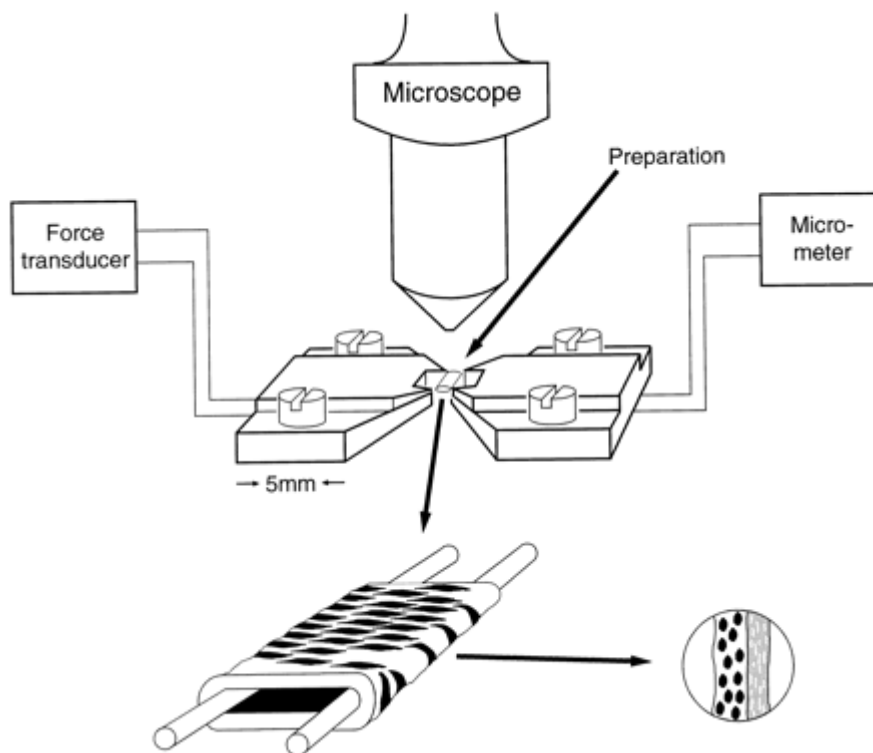
Die präparierten Gefäßringe wurden in den zuvor vorbereiteten Gefäßmyographen (Vessel Myograph, Firma Danish Myo Technologies, DMT Multimyograph Model 610M, Aarhus, Dänemark) eingespannt. Der Myograph (siehe Abbildung) wurde mehrfach mit PSS ausgespült, das Badvolumen des Organbads dann mit PSS



**Abb. 3.1:** Der Myograph DMT-610M der Firma Danish Myo Technologies (Quelle: <http://www.dmt.dk>).

gefüllt. Die Gaszufuhr wurde angeschlossen, um eine kontinuierliche Begasung des Organbads zu gewährleisten. Die Lösung wurde auf  $37^\circ\text{C}$  vorgeheizt. Diese Bedingungen wurden im Verlauf des Experiments so aufrecht erhalten. Das Volumen des Organbads betrug 5 ml.

Die Gefäßringe wurden jetzt mit größter Sorgfalt von der eisgekühlten Präparationslösung in das vorbereitete Organbad gegeben. Unter Mikroskopsicht wurden zwei Stahldrähte der Stärke 0,0394 mm, Belastbarkeit bis 0,022 Kg mit größter Behutsamkeit in das Lumen der Gefäßringpräparationen eingebracht und vorsichtig zwischen Kraftaufnehmer und Lastarm des Myographen eingespannt (Siehe **Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2:** Schematische Zeichnung des Aufbaus des DMT-610M (Quelle: <http://www.dmt.dk>). Erläuterungen im Text.

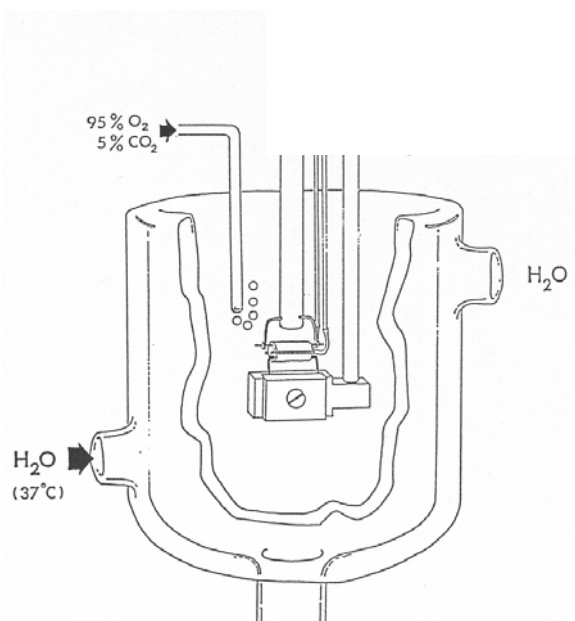
Die eingespannten Gefäßringe wurden jetzt kalibriert, indem sie schrittweise auf 2 mN vorgespannt und eine Stunde so belassen wurden, bis die Spannung konstant auf 2 mN eingestellt war und auf diesem Niveau gehalten werden konnte.

### 3.2.2 Präparation der Aorta

Die Tötung der Ratte geschah wie oben beschrieben. Nach Aufschneiden der Bauchdecke und kompletter Durchtrennung des Sternums wurde die Aorta

dargestellt, indem Leber, Milz, Lunge und Thymus abpräpariert wurden. Die Aorta thoracica wurde vom Herz getrennt und entlang der Wirbelsäule vorsichtig freigelegt und bis zum Übergang in die Aorta abdominalis verfolgt. Am Durchtritt durch das Zwerchfell wurde sie durchtrennt, entnommen und sofort in eisgekühlte und begaste PSS transferiert.

Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop (Nikon SMZ 645). Es wurden ebenfalls zwei Versuchsgruppen gebildet. Pro Aorta wurden zwei Stücke mit periadventitiellem Fettgewebe (+)fat und zwei Stücke ohne Fett (-)fat präpariert. Anschließend erfolgte das Einspannen der Gefäßringe in den zuvor vorbereiteten Myographen für größere Gefäße (Hugo Sachs Elektronik, HSE, Freiburg Deutschland). Zwei kleine Stahldrähte (Durchmesser 0,6 mm) wurden in das Lumen der Gefäßringe eingeführt. Einer der beiden Drähte war mit dem Kraftaufnehmer verbunden (Modell F-30, HSE, Freiburg) und die Gefäßringe wurden über eine Stunde schrittweise auf eine Vorspannung von 2g eingestellt (Löhn *et al.*, 2002). Das Badvolumen betrug 20 ml (Siehe Abbildung).



**Abb. 3.3: Aufbau des Myographen für die Aorta. Erläuterungen im Text. Modifiziert nach (Löhn *et al.*, 2002).**

### **3.3 Isometrische Kontraktionsmessungen an der Mesenterialarterie**

#### **3.3.1 Das Prinzip der isometrischen Kontraktionsmessungen**

Das Ziel des Versuchsaufbaus zur Untersuchung kleiner Blutgefäße dient dem Schaffen experimenteller Bedingungen *in vitro*, die der Situation der Blutgefäße *in vivo* so ähnlich wie möglich sind. Das beinhaltet zum Einen die Imitation der Spannungsverhältnisse im Blutgefäß, sowie zum Anderen einer physiologischen trophischen Situation im Organbad für die Dauer des Experiments.

Die Blutgefäße im Körper von Säugetieren sind den Aufgaben des Kreislaufsystems entsprechend von Blut durchströmt, das die Gefäßwand in einen Dehnungszustand versetzt. Dieser Dehnungszustand ist abhängig von den elastischen Eigenschaften des Gefäßes und dem transmuralen Druck, der im wesentlichen dem intravasalen Druck des Blutgefäßes entspricht.

Der transmurale Druck erzeugt im Blutgefäß in Umfangsrichtung eine tangentielle Wandspannung, die von der Größe des transmuralen Drucks, der Wanddicke und des Innenradius abhängt (Caro *et al.*, 1978).

Die Amplitude der Kraftentwicklung ist in Folge der Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente in allen Muskeln längenabhängig (Huxley *et al.*, 1969). Optimale Kraftentfaltung wird bei einem Optimum an Vorspannung erreicht, bedingt durch den dadurch optimalen Abstand der Aktin-/Myosinfilamente.

Um eine physiologische Situation herzustellen, wurde das Gefäßmuskelpreparat zuerst einer Vorspannung ausgesetzt, die in Relation zum Durchmesser des Gefäßes stand. Diese Vorspannung, im vorliegenden Fall 2 mN (Angus *et al.*, 2000), wurde über eine Stunde aufrecht erhalten und schrittweise nachreguliert, bis das Gefäß auf diesen Wert kalibriert war.

Um die trophische Situation für die Dauer des Experiments (3-4 Stunden) der Situation im Körper anzugleichen, wurde kontinuierlich mit 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> begast, woraus ein pH-Wert von 7,4 resultierte. Die Temperatur wurde auf 37°C eingestellt, die applizierten Lösungen bei 37°C zugegeben.

### 3.3.2 Protokolle

Nach der Vorspannungsphase wurden die Gefäßringe noch einmal auf eine Kraft von 2 mN justiert und es erfolgte eine ca. dreiminütige Probeaufzeichnung. Dann folgte die Applikation einer 60 mM KCl-Lösung. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration hat einen depolarisierenden Effekt auf die Gefäßmuskelzellen (auf ca.  $-20$  mV). Sie führt zu einem erhöhten spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Gefäßmuskelzellen und zu einer maximalen Kontraktion der Gefäßmuskulatur (Gollasch *et al.*, 1995). Eine initiale Applikation von 60 mM KCl-Lösung wurde allen Versuchen vorangestellt.

#### Protokoll 1.1: Dosis-Wirkungskurven

Bei der Anfertigung der Dosis-Wirkungskurven wurden die untersuchten vasokonstriktorisches Agonisten in kumulativ steigenden Dosen zugegeben. Es wurde zuerst 60 mM KCl-Lösung appliziert, anschließend ausgewaschen und danach in PSS rekaliert. Danach wurden die Agonisten appliziert. Das Zugeben der nächst höheren Dosis erfolgte erst dann, wenn das Plateau der Kontraktion erreicht war. **Tabelle 1.1** gibt einen Überblick über die applizierten Dosen der vasokonstriktorisches Agonisten.

**Tab. 1.1.: Folgende Dosen wurden für die einzelnen Agonisten appliziert:**

Wirkstoff	Dosis
Serotonin	10 – 100 – 300 – 700 nM – 1 – 2 – 3,5 – 5 – 6,5 $\mu\text{M}$
Phenylephrin	3 – 10 – 30 – 100 – 300 nM – 1 – 3 – 10 – 30 $\mu\text{M}$
Endothelin I	1 – 3 – 10 – 20 – 30 – 50 nM
U 46619	1 – 3 – 10 – 30 – 100 – 300 nM



### **Protokoll 1.2: Versuche mit Cromakalim**

In diesem Protokoll wurde nach der initialen Stimulation mit 60 mM KCl, sowie anschließendem Auswaschen und Rekalibrieren, der vasokonstriktorisches Agonist Serotonin (2  $\mu$ M) appliziert. Auf dem Plateau der Kontraktionsphase wurde dann der vasodilatatorische  $K_{ATP}$ -Kanalöffner Cromakalim (100 nM) hinzugeben.

### **Protokoll 1.3: Inkubation mit Kaliumkanalblockern**

In diesen Versuchen wurde ebenfalls zunächst KCl appliziert, danach ausgewaschen und rekalibriert. Es erfolgte die Auslösung einer Kontraktion durch Zugabe von Serotonin (2  $\mu$ M). Das Wirkmaximum wurde abgewartet, dann Serotonin ausgewaschen und das Gefäß wieder auf 2 mN rekalibriert. Im nächsten Schritt wurden die entsprechenden Kaliumkanalblocker in das Organbad zugegeben. Es wurde Einwirkzeit von 15-20 Min abgewartet, damit sich die Substanzen zur optimalen extrazellulären Wirkung gleichmäßig im Badvolumen verteilen konnten. Danach wurde erneut Serotonin appliziert. Der Endpunkt dieses Protokolls war mit der Plateauphase der zweiten Gefäßkontraktion erreicht. Bei der Auswertung war dann die Intensität der Kontraktion vor und nach Applikation des Kaliumkanalblockers von Interesse. **Tabelle 1.2** gibt einen Überblick über die eingesetzten Kaliumkanalblocker. Über die Wirkstoffe wurde berichtet, dass sie in der angewendeten Dosierung spezifisch für die Blockade des entsprechenden Kaliumkanals sind (Kohler *et al.*, 1996; Kovacs *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 1995)

**Tabelle 1.2 Dosierungen der angewendeten Kaliumkanalantagonisten:**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Dosis</b>
<b>3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP)</b>	1 $\mu$ M
<b>4-Aminopyridin (4-AP)</b>	2 mM
<b>Apamin</b>	1 $\mu$ M
<b>Glibenclamid</b>	3 $\mu$ M
<b>Ibextotoxin (IbTx)</b>	100 nM
<b>Tetraethylammonium (TEA)</b>	1 mM
<b>Tetrapentylammonium (TPeA)</b>	10 $\mu$ M

### **3.3.3 Datenerfassung**

Die vom Kraftaufnehmer registrierten Tonusänderungen wurden in mN registriert, vom Computerprogramm Myodaq 2.01 M610+ gegen die Zeit abgenommen und graphisch dargestellt sowie auf einem PC gespeichert.

### **3.3.4 Datenanalyse und statistische Auswertung**

Die Daten wurden mit dem Computerprogramm Myodaq 2.01 M610+ normalisiert. Die maximale Antwort auf Inkubation mit 60 mM KCl-Lösung wurde als 100 % gesetzt.

Die Erfassung und Speicherung der Daten erfolgte in Excel-Tabellen. Zur Auswertung und graphischen Darstellung wurden sie in die Computerprogramme SigmaPlot 7 oder Origin 7.0 übertragen.

Die Datenanalyse und statistische Auswertung erfolgte mittels des Computerprogramms SigmaStat (Jandel Scientific, USA).

Die Daten wurden als arithmetische Mittelwerte berechnet. Als Streuungsmaß diente die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM). Alle Messwerte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Der Term „n“ steht für die Anzahl der gemessenen Gefäßringe. Zur Signifikanzprüfung kamen der STUDENT t-Test für unabhängige und verbundene Stichproben zur Anwendung. Messungen am gleichen Gefäßring wurden als verbundene Stichproben paarweise verglichen (Protokolle 1.2 und 1.3). Vergleiche der Messergebnisse von Gefäßringen (+)fat und (-)fat wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben getestet (Protokoll 1.1, 1.2, 1.3). Ein Unterschied wurde als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit bei  $p < 0,05$  lag.

Die weitere Bearbeitung der in Origin 7,0 erstellten Graphen erfolgte mittels des Computerprogramms Corel Draw 9.

### 3.4 Isometrische Kontraktionsmessung an der Aorta

Die Gefäßringe wurden für die Dauer einer Stunde schrittweise auf eine Vorspannung von ca. 2 g eingestellt. Verwendete Lösungen, sowie Einstellungen bezüglich der Temperatur und Begasung entsprachen dem oben Beschriebenen.

#### 3.4.1 Protokolle

##### Protokoll 2.1: Inkubation mit Inhibitoren der verschiedenen Proteinkinasen

Nach Kontraktion mit 60 mM KCl, Auswaschen und Rekalibrieren, erfolgte eine Kontraktion mit Serotonin in der Konzentration 0,7  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M. Nach erneutem Auswaschen und Rekalibrieren erfolgte die 15-20 minütige Inkubation mit dem entsprechenden Inhibitor der PKA (H-89, 9  $\mu$ M), PKG (KT5823, 2  $\mu$ M) und TK (Tyrphostin A25, AG82), 10  $\mu$ M). Danach wurde erneut Serotonin appliziert. Die Unterschiede in der maximalen Kontraktion vor und nach Inkubation mit dem entsprechenden Antagonisten waren von Interesse.

Über die angewendeten Wirkstoffe wurde berichtet, dass sie in der applizierten Dosierung spezifisch für die selektive Blockierung der Enzyme sind. Für die Blocker der Tyrosinkinase Genistein und Tyrphostin (Wang *et al.*, 2002) und die inaktiven Genistein-Homologa ST638 und Daidzein (Wang *et al.*, 2002) wurde dies belegt. Der Wirkstoff H-89 blockt die PKA (Schubert *et al.*, 1999; Wellman *et al.*, 1998), aber auch die Rho-Kinase (Feng *et al.*, 1999; Leemhuis *et al.*, 2002; Shum *et al.*, 2003) und die PKG (Brunetti *et al.*, 2002). **Tabelle 1.3** gibt einen Überblick über die angewendeten Dosierungen der Wirkstoffe.

**Tabelle 1.3: Dosierungen der angewendeten Wirkstoffe**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Dosis</b>
Daidzein	10 $\mu$ M
Genistein	10 $\mu$ M
H-89	9 $\mu$ M
KT-5823	0.5 $\mu$ M
ST-638	10 $\mu$ M
Tyrphostin A25 (AG82)	10 $\mu$ M

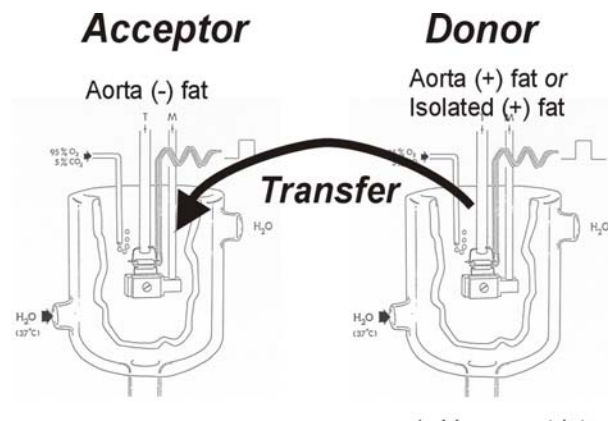
## **Protokoll 2.2: Bioassay**

In diesem Versuchsansatz sollte der Freisetzungsmechanismus von ADRF erforscht werden. Zu diesem Zweck kam ein Bioassay zum Einsatz, wie es bereits bei der Erstbeschreibung von ADRF angewendet wurde (Löhn *et al.*, 2002).

Nach der initialen Kontraktion mit KCl wurden beide Gruppen von Gefäßringen mit Serotonin (0,7  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M) kontrahiert. Die Gefäßringe (+)fat wurden mit einem Antagonisten des entsprechenden Signaltransduktionswegs [PKA (H-89, 9  $\mu$ M), PKG (KT5823, 2  $\mu$ M) und TK (Tyrphostin A25, 10  $\mu$ M)] inkubiert und erneut mit Serotonin (2  $\mu$ M) stimuliert. Die Organbadkammer mit den Gefäßringen (+)fat wurde „**Donor**“ genannt, da das periadventitielle Fettgewebe als Donor für ADRF fungiert. Im Folgenden wurde auf der Plateauphase der Kontraktion mit 2  $\mu$ M Serotonin Flüssigkeit aus dem Organbad entnommen und in die Organbadkammer mit den Gefäßringen (-)fat gegeben, die „**Akzeptor**“ genannt wurde. Die glatten Gefäßmuskelzellen sind die Effektoren von ADRF.

Bei dem Gegenexperiment wurden die „**Akzeptor**“-Gefäßringe, das heißt die Ringe (-)fat, mit dem Inhibitor des entsprechenden Enzymsystems inkubiert. Die Flüssigkeit, die aus dem Organbad mit den „**Donor**“-Gefäßringen [(+)fat] ohne Zugabe eines inhibitorischen Wirkstoffs gewonnen wurde, wurde appliziert.

Ziel dieses Versuchsaufbaus war es, differentielle Aussagen über den Mechanismus der Freisetzung bzw. Wirkung von ADRF machen zu können. Indem zwischen Donor, der Seite der Gefäßringe (+)fat, in der vermutlich ADRF freigesetzt wird, und Akzeptor, der Seite der Gefäßringe (-)fat, unterschieden wird, lassen sich Rückschlüsse auf zugrunde liegende Mechanismen der Freisetzung oder Wirkung ziehen.



**Abb. 3.4.:** Skizze des Versuchsaufbaus der Badwechsel-Experimente: In der Organbadkammer, die mit „Donor“ gekennzeichnet ist, sind die Gefäßringe (+)fat lokalisiert, Ort der ADRF-Freisetzung. Als „Akzeptor (Acceptor)“ ist die Organbadkammer mit den Gefäßringen (-)fat gekennzeichnet, Wirkort von ADRF. Entsprechend des eingesetzten Protokolls erfolgte ein Austausch bestimmter Mengen der Organbadflüssigkeit (Pfeil). Quelle: (Löhn *et al.*, 2002).

### Protokoll 2.3: Bioassay ohne Kalziumionen

Die Donor-Gefäßringe wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Kalziumionen vorinkubiert (0 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 1,6 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 10mM), und mit 2  $\mu$ M Serotonin kontrahiert. Es wurden Aliquots dieser Lösung (jeweils 5 ml) in die Akzeptor-Organbadkammer transferiert. Das Organbadvolumen betrug 20 ml, das Transferintervall 15-20 Min.

#### **3.4.2 Datenerfassung und Auswertung**

Die Daten wurden mit dem Computerprogramm HSE-Acad erfasst, und mit einem Papieraufzeichnungsgerät graphisch dargestellt und ausgewertet. Alle Messwerte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben und mit STUDENT t-Test für verbundene und unverbundene Stichproben auf statistische Signifikanz geprüft. Unterschiedliche Messungen am gleichen Gefäßring wurden als verbundene Stichproben paarweise verglichen. Vergleiche der Messergebnisse von Gefäßringen (+)fat und (-)fat wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben getestet. Die Unterschiede waren signifikant, wenn  $p < 0,05$ . Der Term „n“ steht für die Zahl der untersuchten Gefäßringe.

### 3.5 Reagenzien und Chemikalien

Folgende Reagenzien und Chemikalien wurden verwendet:

3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP)	Sigma, Deisenhofen
4-Aminopyridin (4-AP)	Sigma, Deisenhofen
5-Hydroxytryptamin (Serotonin)	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Apamin	Sigma, Deisenhofen
Azetylcholin (ACh)	Sigma, Deisenhofen
Cromakalim	Sigma, Deisenhofen
Daidzein	Calbiochem, Beeston, Nottingham, UK
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
Endothelin I	Sigma, Deisenhofen
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Genistein	Calbiochem, Beeston, Nottingham, UK
Glibenclamid	Sigma, Deisenhofen
Glukose	Merck, Darmstadt
H-89	Calbiochem, Beeston, Nottingham, UK
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
KT5823	Calbiochem, Beeston, Nottingham, UK
Karbogen	Linde Gas AG, Höllriegelskreuth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Phenylephrin	Sigma, Deisenhofen
ST628	Calbiochem, Beeston, Nottingham, UK
Tetraethylammoniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Tetrapentylammoniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Tyrphostin A25 (AG82)	Calbiochem, Beeston, Nottingham, UK
U46619	Sigma, Deisenhofen

## 4 *Ergebnisse*

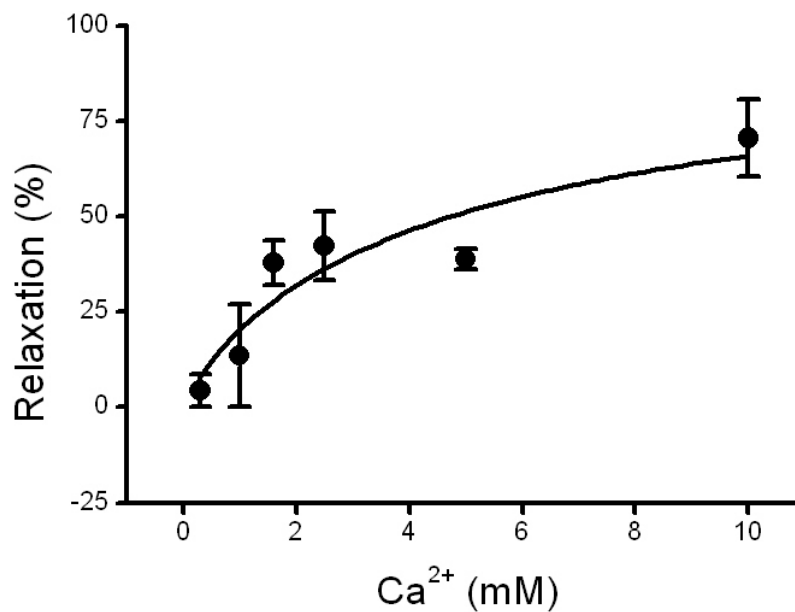
### 4.1 **Regulation der ADRF-Freisetzung aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Rattenaorta**

#### 4.1.1 **Kalziumabhängigkeit der ADRF-Freisetzung**

Um zu zeigen, dass die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe ein kalziumabhängiger Prozess ist, wurde ein Bioassay-Versuchsansatz (**Protokoll 2.3**) angewendet. Die Donor-Organbadkammer wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von freien Kalziumionen (0 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 1,6 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 10 mM, jeweils 15-20 Min) vorinkubiert und die Gefäßringe wurden mit Serotonin (2  $\mu$ M) kontrahiert. Aliquots aus der ADRF-haltigen Donor-Organbadkammer wurden dann in die Organbadkammer der Akzeptorgefäßringe (-)fat transferiert, die ebenfalls mit Serotonin (2  $\mu$ M) vorkontrahiert wurden. Die Dosis-Wirkungskurve für die Relaxation der Aorta durch ADRF, das bei unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen in die Donorbadlösung freigesetzt wurde, ist in **Abb. 4.1** gezeigt. Bei einer Kalziumkonzentration von 0 mM in der Donor-Badlösung bewirkten Aliquots aus dieser Lösung keine Relaxation von Akzeptorgefäßringen (-)fat (PSS, 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM EGTA). Das Ausmaß der Relaxation nahm mit steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Donor-Badlösung zu. In der Abbildung sind die Datenpunkte durch eine Linie verbunden, die gemäß der folgenden Formel an die Einzelwerte angepasst wurde:

$$R(\%) = 100\% / \{1 + (\text{EC}_{50}/[\text{Ca}^{2+}])^n\}$$

wobei R der Prozentsatz der Vasorelaxation ist,  $\text{EC}_{50}$  die Kalziumkonzentration bei der eine halbmaximale Relaxation beobachtet wurde, n der Hill-Koeffizient,  $[\text{Ca}^{2+}]$  die Kalziumkonzentration in der die (+)fat Ringe inkubiert wurden. Es erfolgte eine halbmaximale Relaxation bei einer Kalziumkonzentration von  $4,7 \pm 1,2$  mM  $\text{Ca}^{2+}$  und n entspricht  $0,9 \pm 0,2$ .

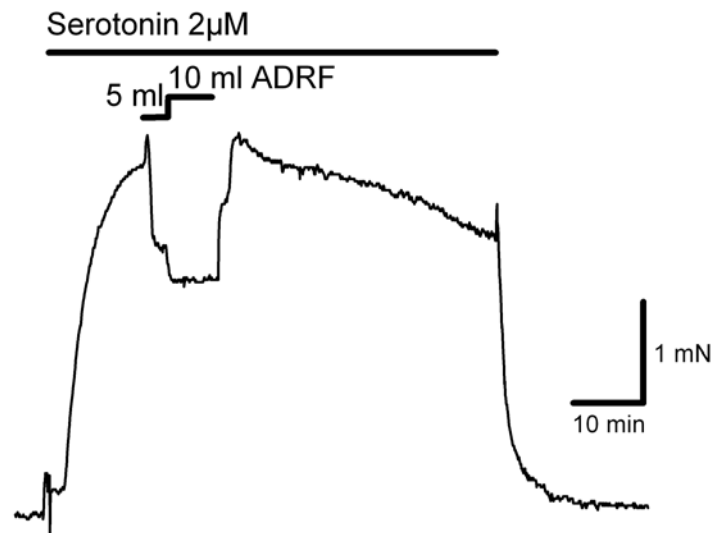


**Abb. 4.1.:** Kalziumabhängigkeit der ADRF-Freisetzung. Im Badwechselexperiment (Protokoll 2.3) wurde eine Dosis-Wirkungskurve für die Kalziumabhängigkeit der ADRF-Freisetzung erstellt. Mit Serotonin (2  $\mu$ M) kontrahierte Donor-Ringe wurden mit PSS unterschiedlicher Kalziumkonzentration inkubiert (0 mM, 0,3 mM, 1,0 mM, 1,6 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 10 mM), entsprechend n = 4, 3, 3, 8, 5, 6, 4. Das Volumen des Organbads betrug 20 ml. Teile (Aliquots, jeweils 5 ml) der Donor-Badlösung wurden dann auf die ebenfalls mit Serotonin (2  $\mu$ M) vorkontrahierten Akzeptor-Ringe gegeben. Es zeigte sich, dass das Ausmaß der Relaxation der Akzeptor-Gefäßringe von der Kalziumkonzentration in der Lösung der Donor-Gefäßringe abhängig war.

#### 4.1.2 Reversibilität der ADRF-Wirkung

Um zu untersuchen, ob die durch ADRF ausgelöste Vasorelaxation reversibel ist, wurden Bioassay-Versuche nach **Protokoll 2.2** durchgeführt. Die Donorgefäßringe wurden mit 2  $\mu$ M Serotonin kontrahiert. Teile der Lösung (2 x 5 ml) wurden entnommen und auf die Akzeptorgefäßringe transferiert. Der Transfer der Lösung resultierte in einer dosisabhängigen Relaxation der Gefäßringe (-)fat. **Abb. 4.2** zeigt, dass nachdem die Vasorelaxation der Akzeptorgefäßringe eingetreten war und die Aliquot-haltige Bad-Lösung durch Zugabe von frischer PSS ausgewaschen wurde, die Relaxation vollständig reversibel war.

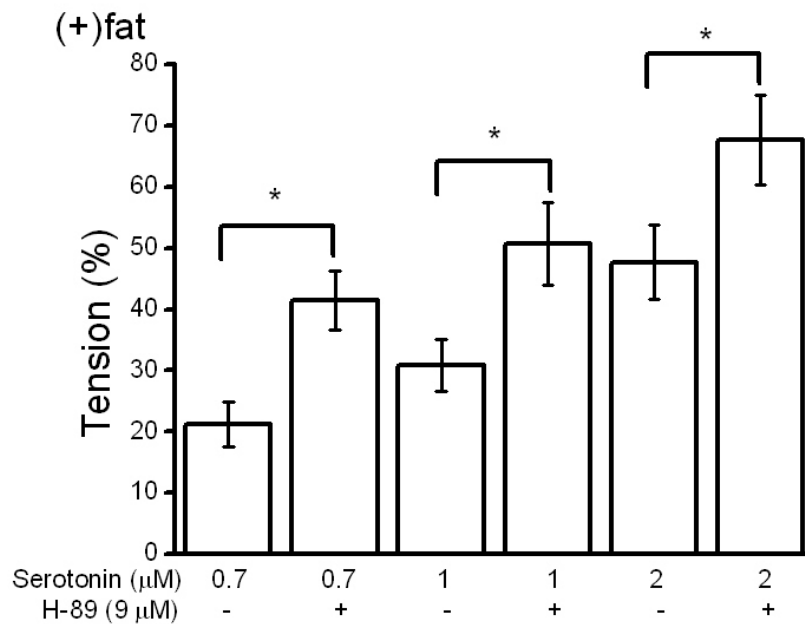
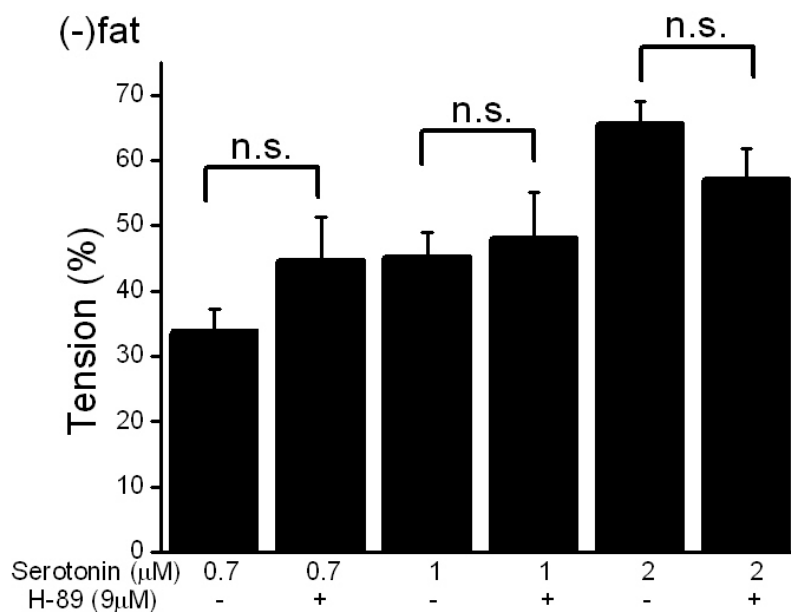




**Abb 4.2.: Reversibilität der ADRF-Wirkung:** Die Relaxation der Akzeptor-Gefäßringe konnte durch Auswaschen der ADRF-haltigen Lösung rückgängig gemacht werden. In der Abbildung sieht man einen Akzeptor-Gefäßring, der zuerst mit 5 ml, dann weiteren 5 ml ADRF-haltiger PSS aus der Donor-Badlösung inkubiert wurde. Die dadurch erzeugte Relaxation konnte durch Auswaschen der ADRF-haltigen Lösung mit frischer PSS rückgängig gemacht werden.

#### 4.1.3 Regulation der ADRF-Freisetzung über PKA

Um die Rolle der Proteinkinase A (PKA) bei der Freisetzung von ADRF zu untersuchen, wurde die PKA durch den spezifischen Inhibitor H-89 (9  $\mu\text{M}$ ) inhibiert. Dazu wurden entsprechend **Protokoll 2.1** beide Gefäßgruppen (+)fat und (-)fat zuerst mit Serotonin (0,7  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,0  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Nach Auswaschen von Serotonin wurden die Gefäßringe (+)fat und (-)fat mit H-89 (9  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und danach erneut mit Serotonin stimuliert (n=6). Es zeigte sich, dass Serotonin stärkere kontraktile Antworten nach Inkubation mit H-89 in Gefäßringen (+)fat induzierte, während die Serotonin-abhängigen Kontraktionen bei den Gefäßringen (-)fat nicht durch H-89-Vorbehandlung der Gefäßringe beeinflusst wurden ( $p \geq 0,05$ ). **Abb. 4.3 A und B** zeigen diese Befunde.

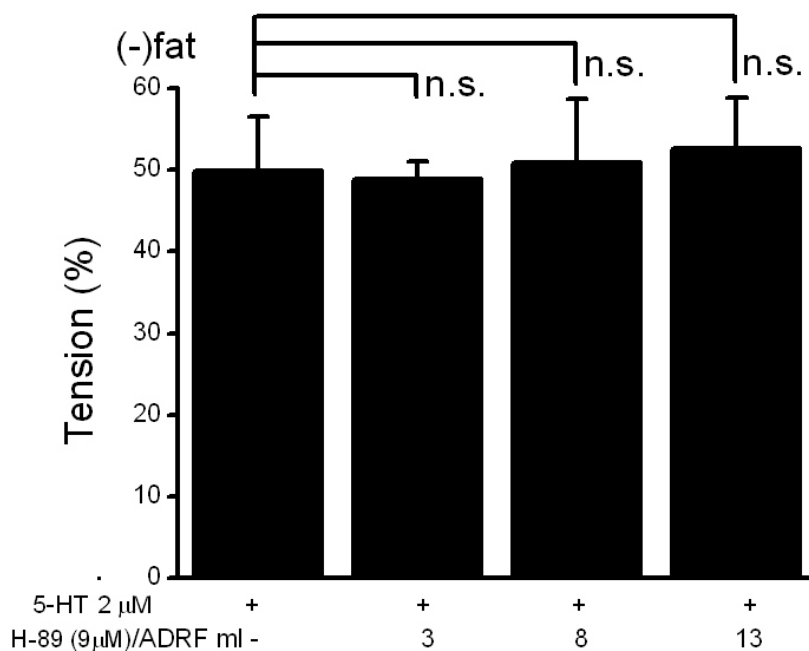
**A****B**

**Abb. 4.3.:** Bei Gefäßringen (+)fat zeigte sich eine signifikante Erhöhung der kontraktiven Antwort durch Serotonin, wenn die Gefäßringe mit H-89 vorhanden wurden (n=6) (A). \*,  $p < 0,05$ . Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat in Anwesenheit von H-89 waren nicht unterschiedlich im Vergleich zu Kontraktionen in Abwesenheit von H-89 (n=6,  $p \geq 0,05$ ) (B). +, -, An- bzw. Abwesenheit der Substanzen.

Um zu erfahren, ob der beobachtete Effekt durch eine Blockade der Freisetzung oder Wirkung von ADRF durch H-89 zu Stande kommt, wurde ein Bioassay-Experiment nach **Protokoll 2.2** angewendet.

**Abb. 4.4. A** zeigt die Ergebnisse. Zuerst wurden Donorgefäßringe (+)fat mit Serotonin (2  $\mu$ M) kontrahiert. Dann erfolgte die Inkubation (10-15 Min) der Donorgefäßringe (+)fat mit H-89 (9  $\mu$ M). Nach erneuter Stimulation mit Serotonin (2  $\mu$ M) wurden additiv Aliquots (3 ml, 5 ml, 5 ml) des Organbads der Donorgefäßringe (+)fat in das Organbad der Akzeptorgefäßringe (-)fat transferiert. Es zeigte sich, dass nach Zugabe der Aliquots keine Relaxation der Gefäßringe (-)fat in der Akzeptorbadkammer stattfand. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Aliquots keine signifikanten Mengen von ADRF enthielten und H-89 die Freisetzung von ADRF aus dem Donorgefäß (+)fat hemmte.

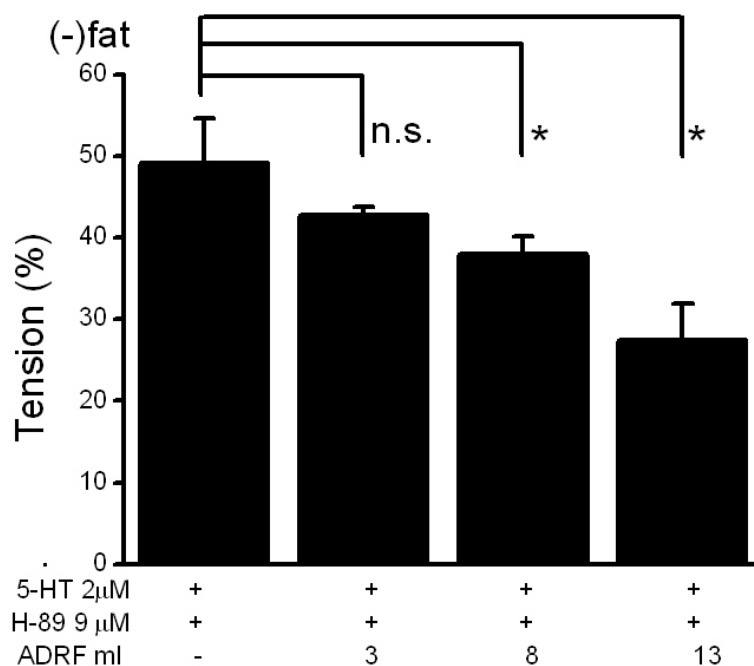
**A**



**Abb. 4.4. A:** Applikation von H-89 (9  $\mu$ M) zur Badlösung der Donorgefäßringe (+)fat hemmte die Relaxation von Akzeptorgefäßringen (-)fat durch Aliquots aus der Badlösung der Donorgefäßringe. Die Donorgefäßringe [(+)fat] wurden mit H-89 (9  $\mu$ M) vorinkubiert. Beide Gruppen [(+)fat und (-)fat] wurden mit Serotonin (2  $\mu$ M) vorkontrahiert. Es erfolgte ein additiver Transfer von Teilen (Aliquots von 3 ml, 5 ml, 5 ml) der Badlösung der Donorgefäßringe (+)fat zur Badlösung der Akzeptorgefäßringe (-)fat. Die Aliquots bewirkten keine Relaxation der Akzeptorgefäßringe (jeweils  $n=6$ ,  $p \geq 0,05$ ).

Demgegenüber kann man in **Abb. 4.4 B** sehen, dass die additive Zugabe von Aliquots ADRF-haltiger Badlösung aus der Organbadkammer der Donorgefäßringe (+)fat Akzeptorgefäßringe (-)fat relaxierte, wenn die Gefäßringe (-)fat in der Akzeptor-Organbadkammer mit H-89 vorbehandelt wurden. Hier wurden entsprechend **Protokoll 2.2** die Akzeptorgefäßringe (-)fat mit H-89 (9  $\mu$ M) 15-20 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Donorgefäßringe (+)fat und der Akzeptorgefäßringe (-)fat mit Serotonin (2  $\mu$ M). Im Folgenden wurden additiv Aliquots (3 ml, 5 ml, 5 ml) der Donorbadlösung in das Akzeptor-Organbad transferiert. In der Abbildung kann man sehen, dass diese Aliquots eine signifikante Relaxation der Serotonin-vokontrahierten Akzeptorgefäßringe (-)fat bewirkten. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe freigesetzt wurde und nicht der relaxierende Effekt von ADRF am Gefäßmuskel durch H-89 (9  $\mu$ M) blockiert wurde.

## B



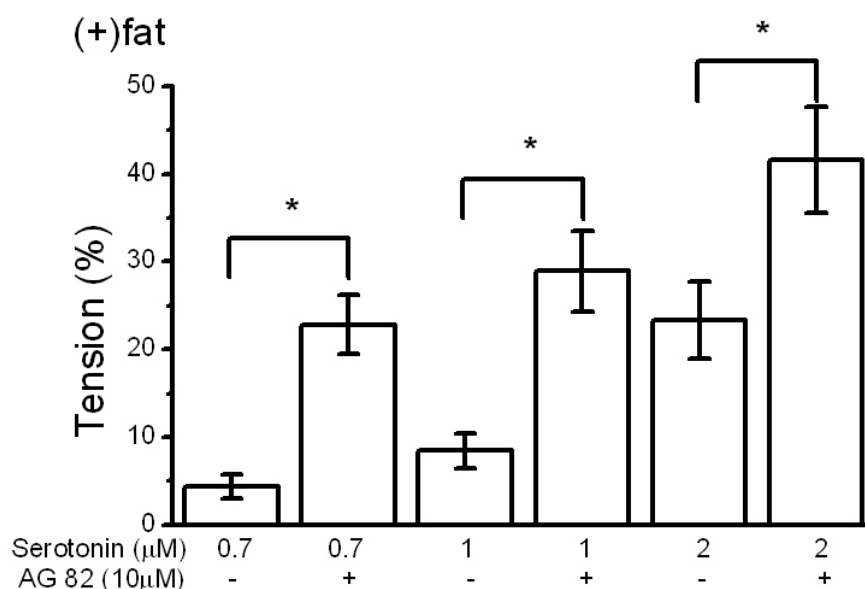
**Abb. 4.4 B:** Inkubation der Akzeptorgefäßringe (-)fat mit H-89 (9  $\mu$ M) hemmte nicht die relaxierende Wirkung von ADRF-haltigen Aliquots der Badlösung aus der Donororganbadkammer. Beide Gefäßgruppen [(+)fat und (-)fat] wurden mit Serotonin (2  $\mu$ M) vokontrahiert. Es erfolgte eine additive Zugabe von 3 ml, 5 ml und 5 ml der ADRF-haltigen Lösung aus der Donororganbadkammer mit den Gefäßringen (+)fat zu den Akzeptorgefäßringen (-)fat. n=6; \*, p<0,05 im Vergleich zu den Kontrollwerten vor Gabe der ADRF-haltigen Aliquots (linker Balken).

#### 4.1.4 Regulation der ADRF-Freisetzung über Tyrosinkinase

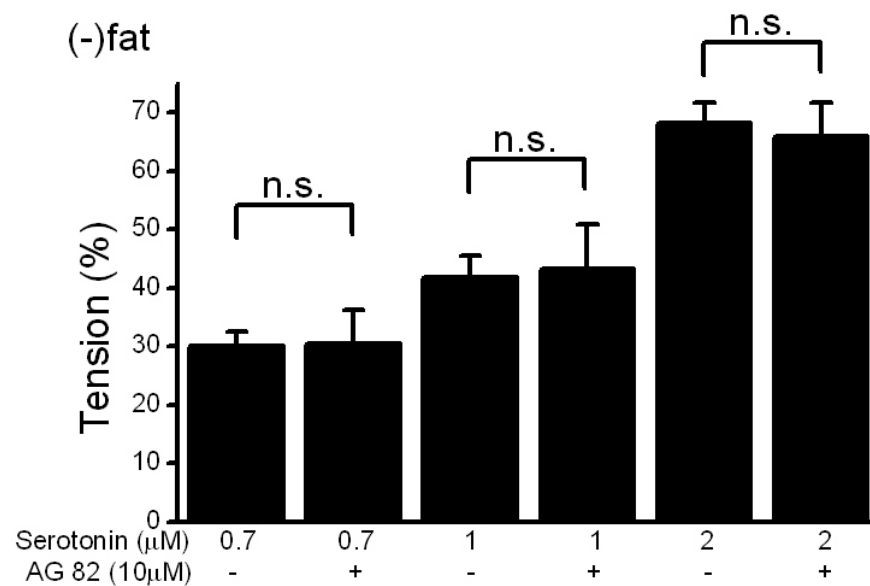
Im Folgenden wurde die Hypothese getestet, ob die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe durch Tyrosinphosphorylierung reguliert wird. Gemäß **Protokoll 2.1** erfolgte eine selektive Hemmung der Tyrosinkinase durch Tyrphostin A25 (AG82, 10  $\mu$ M).

In **Abb. 4.5 A und B** kann man sehen, dass Tyrphostin A25 (AG82, 10  $\mu$ M) in der Organbadlösung der Gefäßringe (+)fat eine Verstärkung des kontraktile Effekts von Serotonin bewirkte (n=5). Beide Gefäßgruppen (+)fat und (-)fat wurden zuerst mit Serotonin (0,7  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M) stimuliert. Nach Auswaschen von Serotonin wurden die Gefäßringe (+)fat und (-)fat mit AG82 (10  $\mu$ M) 15-20 Min. inkubiert und danach erneut mit Serotonin stimuliert. Serotonin induzierte stärkere kontraktile Antworten nach Inkubation mit AG82 in Gefäßringen (+)fat, während die Serotonin-abhängigen Kontraktionen bei den Gefäßringen (-)fat nicht durch AG82-Vorbehandlung der Gefäßringe beeinflusst wurden.

**A**



**Abb. 4.5 A:** Bei den Gefäßringen (+)fat zeigte sich eine signifikante Erhöhung der kontraktile Antwort durch Serotonin, wenn die Gefäßringe mit AG82 vorhanden waren (n=5). \*, p<0,05.

**B**

**Abb. 4.5 B: Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat in Anwesenheit AG82 waren nicht unterschiedlich im Vergleich zu Kontraktionen in Abwesenheit von AG82 (n=5,  $p \geq 0,05$ ). In Abwesenheit von AG82 waren die Serotonin-abhängigen Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat schwächer als die Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat. +, -, An- bzw. Abwesenheit der Substanzen.**

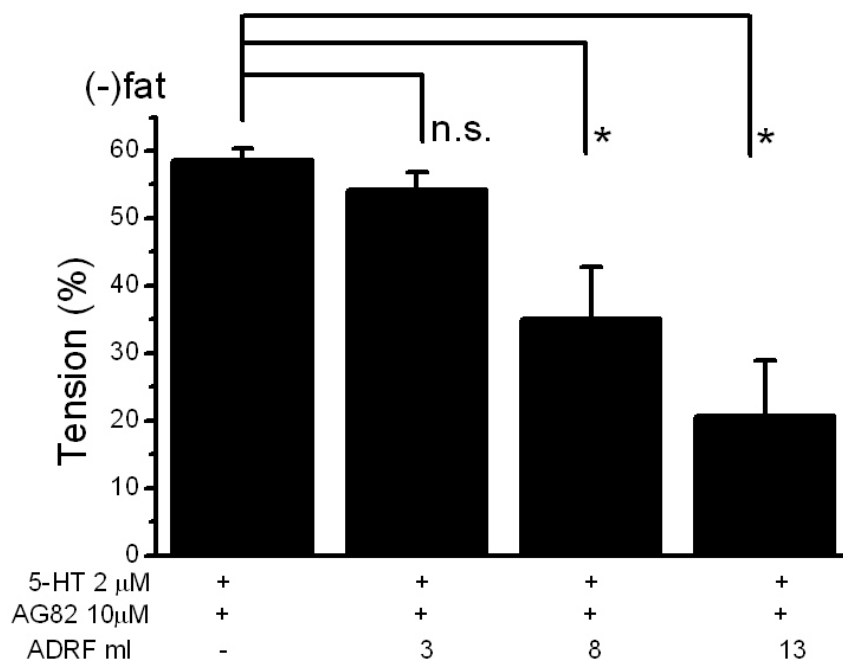
Um zu differenzieren, ob AG82 die Freisetzung von ADRF oder deren Wirkung am Gefäßmuskel hemmte, wurde ein Bioassay gemäß **Protokoll 2.2** durchgeführt.

**Abb. 4.6 A** zeigt, dass die additive Zugabe von Aliquots ADRF-haltiger Badlösung aus der Organkammer von Donorgefäßringen (+)fat die Akzeptorgefäßringe (-)fat relaxierte, wenn die Gefäßringe (-)fat in der Akzeptor-Organ kammer mit AG82 vorbehandelt wurden. Hier wurden entsprechend **Protokoll 2.2** die Akzeptorgefäßringe (-)fat mit AG82 (10 μM) 15-20 Min inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Donorgefäßringe (+)fat und der Akzeptorgefäßringe (-)fat mit Serotonin (2 μM). Im Folgenden wurden additiv Aliquots (3 ml, 5 ml, 5 ml) der Donorbadlösung in das Akzeptor-Organbad transferiert. Man kann sehen, dass diese Aliquots eine signifikante Relaxation der Serotonin-vorkontrahierten Akzeptorgefäßringe (-)fat bewirkten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die relaxierende Wirkung von ADRF am Gefäßmuskel nicht durch AG82 blockiert

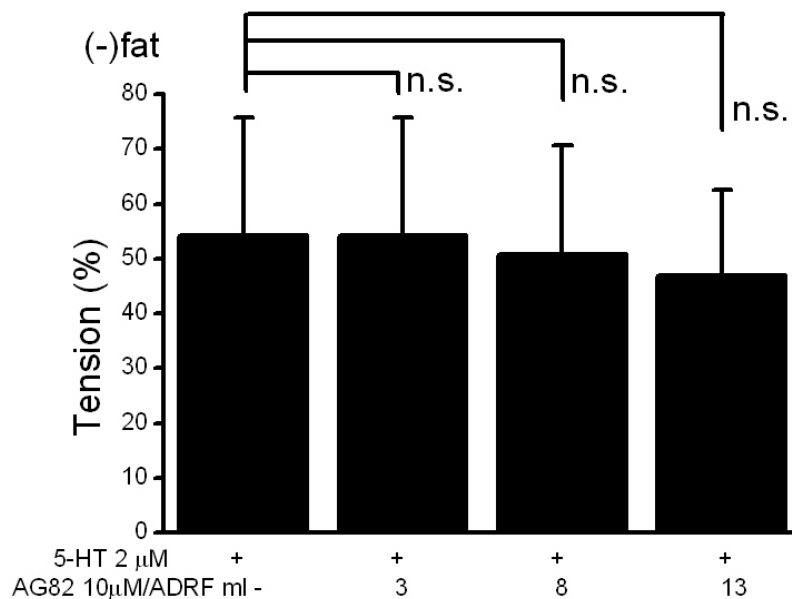
wurde. Die Daten ließen vermuten, dass AG82 die Freisetzung von ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe hemmte.

**Abb 4.6 B** zeigt Ergebnisse, die diese Vermutung bestätigen. In den Versuchen wurden zuerst Donorgefäßringe (+)fat mit Serotonin (2  $\mu$ M) kontrahiert. Dann erfolgte die Inkubation (10-15 Min) der Donorgefäßringe (+)fat mit AG82. Nach erneuter Stimulation mit Serotonin (2  $\mu$ M) wurden additiv Aliquots (3 ml, 5 ml, 5 ml) des Organbads der Donorgefäßringe (+)fat in das Organbad der Akzeptorgefäßringe (-)fat transferiert. Es zeigte sich, dass die Zugabe der Aliquots keine Relaxation der Gefäßringe (-)fat in der Akzeptorbadekammer bewirkte. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass AG82 die Freisetzung von ADRF aus dem Donorgefäß (+)fat hemmte. Daraus konnte man den Schluss ziehen, dass die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe vermutlich durch Blockade der Tyrosinkinase gehemmt wurde.

**A**



**Abb. 4.6 A:** Inkubation der Akzeptorgefäßringe (-)fat mit Tyrphostin A25 (AG82, 10  $\mu$ M) hemmte nicht die relaxierende Wirkung von ADRF-haltigen Aliquots der Badlösung aus der Donororgankammer, in der sich die Gefäßringe (+)fat befanden. Beide Gefäßgruppen [(+)fat und (-)fat] wurden mit Serotonin (2  $\mu$ M) vorkontrahiert. Es erfolgte eine additive Zugabe von 3 ml, 5 ml und 5 ml der ADRF-haltigen Lösung aus der Donorbadkammer zu den Akzeptorgefäßringen (-)fat. n=5; \*, p<0,05 im Vergleich zu den Kontrollwerten vor Gabe der ADRF-haltigen Aliquots (linker Balken).

**B**

**Abb. 4.6 B:** Applikation von Tyrphostin (AG82, 10 µM) zur Badlösung der Donorgefäßringe (+)fat hemmte die Relaxation von Akzeptorgefäßringen (-)fat durch Aliquots aus der Badlösung der Donorgefäßringe. Die Donorgefäßringe [(+)fat] wurden mit AG82 (10 µM) vorinkubiert. Beide Gruppen [(+)fat und (-)fat] wurden mit Serotonin (2 µM) vorkontrahiert. Es erfolgte ein additiver Transfer von Teilen (Aliquots von 3 ml, 5 ml, 5 ml) der Badlösung der Donorgefäßringe (+)fat zur Badlösung der Akzeptorgefäßringe (-)fat. Die Aliquots bewirkten keine Relaxation der Akzeptorgefäßringe (jeweils n=4, p≥0,05).

Um die Hypothese zu überprüfen, ob eine funktionsfähige Tyrosinkinase für den antikontraktilen ADRF-Effekt verantwortlich ist, wurden Experimente mit anderen Inhibitoren der Tyrosinkinase nach **Protokoll 2.1** durchgeführt. Die Gefäßringe (+)fat und (-)fat wurden in diesem Experiment mit Phenylephrin (100 nM) stimuliert. Nach Auswaschen von Phenylephrin wurden die Gefäßringe mit dem Tyrosinkinase-Hemmstoff Genistein (10 µM) bzw. den inaktiven Tyrosinkinase-Hemmstoffen Daidzein (10 µM) oder ST638 (10 µM) inkubiert. Nachfolgend wurde erneut Phenylephrin (100 nM) appliziert. Die Phenylephrin-Kontraktionen wurden in Ab- und Anwesenheit von Genistein, Daidzein bzw. ST638 miteinander verglichen.

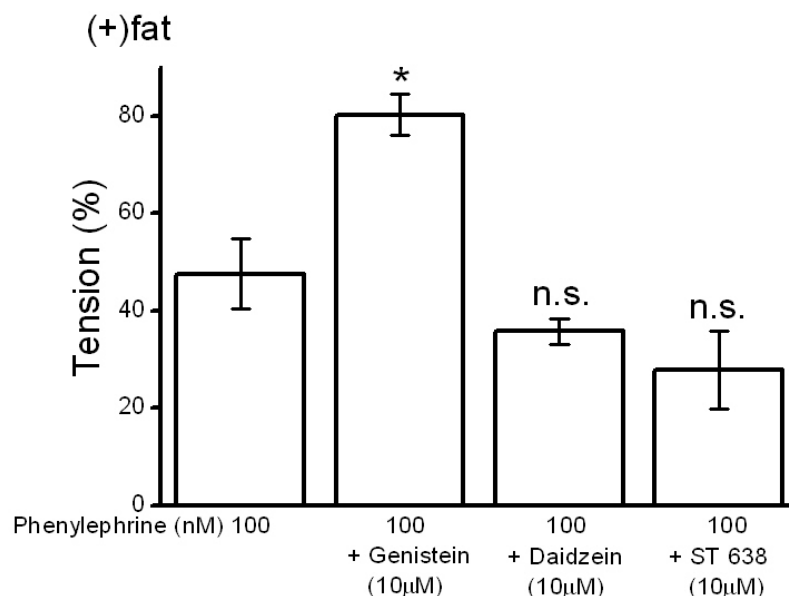
**Abb. 4.7 A** zeigt, dass Genistein (10 µM) die Phenylephrin-abhängige Kontraktion von Gefäßringen (+)fat steigerte. Daidzein (10 µM) und ST638 (10 µM) bewirkten



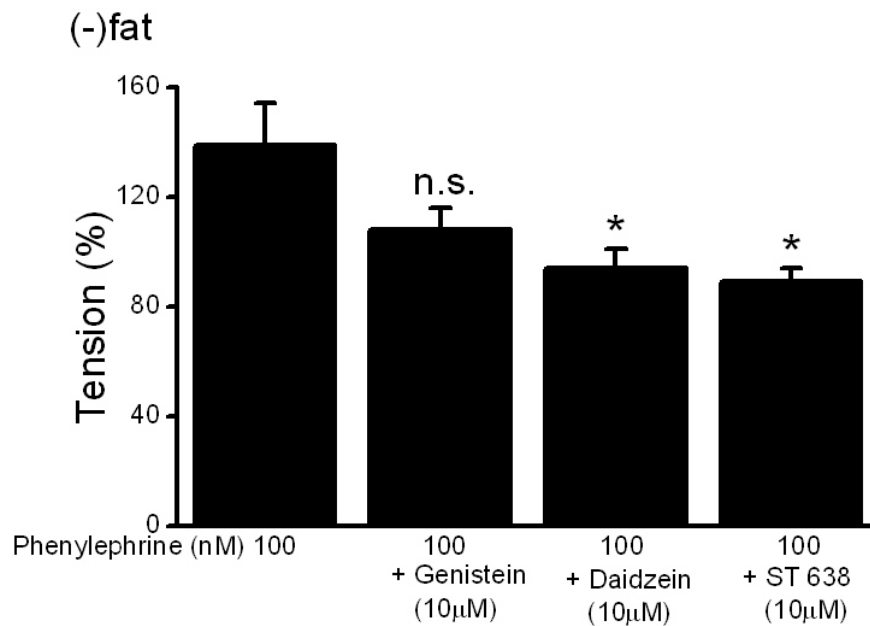
keine Verstärkung der Phenylephrin-abhängigen Kontraktion von Gefäßringen (+)fat. Diese Ergebnisse standen in Einklang mit der Folgerung, dass die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe vermutlich durch Blockade von Tyrosinkinase gehemmt wurde.

In **Abb. 4.7 B** ist zu sehen, dass die Phenylephrin-abhängige Kontraktion von Gefäßringen (-)fat nicht durch Genistein (10  $\mu$ M) beeinflusst wurde. Daidzein (10  $\mu$ M) und ST638 (10  $\mu$ M) bewirkten eine geringfügige Gefäßrelaxation.

## A



**Abb. 4.7 A:** Genistein verstärkte Phenylephrin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat (n=4, paarweiser Vergleich,  $p < 0,05$ ) allerdings nicht von Gefäßringen (-)fat (Siehe Abb. 4.7 B umseitig)(n=4, paarweiser Vergleich,  $p \geq 0,05$ ). Daidzein und ST638 hatten keinen Effekt auf Phenylephrin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat und (-)fat (jeweils n=4, paarweiser Vergleich,  $p \geq 0,05$ ). Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat waren schwächer als von Gefäßringen (-)fat. Zur graphischen Illustration wurden die Effekte von 100 nM Phenylephrin in der Abwesenheit von Genistein, Daidzein und ST638 in einem Balken zusammengefasst (jeweils linker Balken in A und B) \*,  $p < 0,05$ .

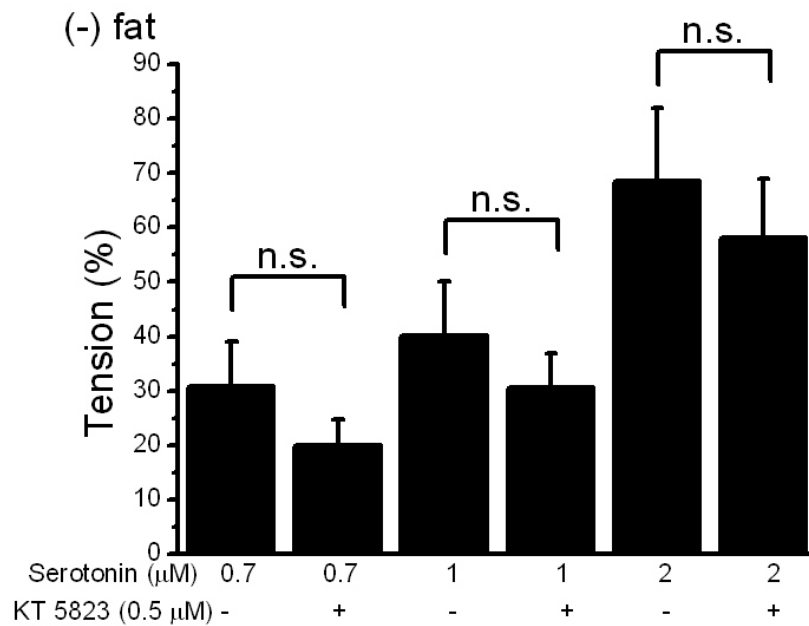
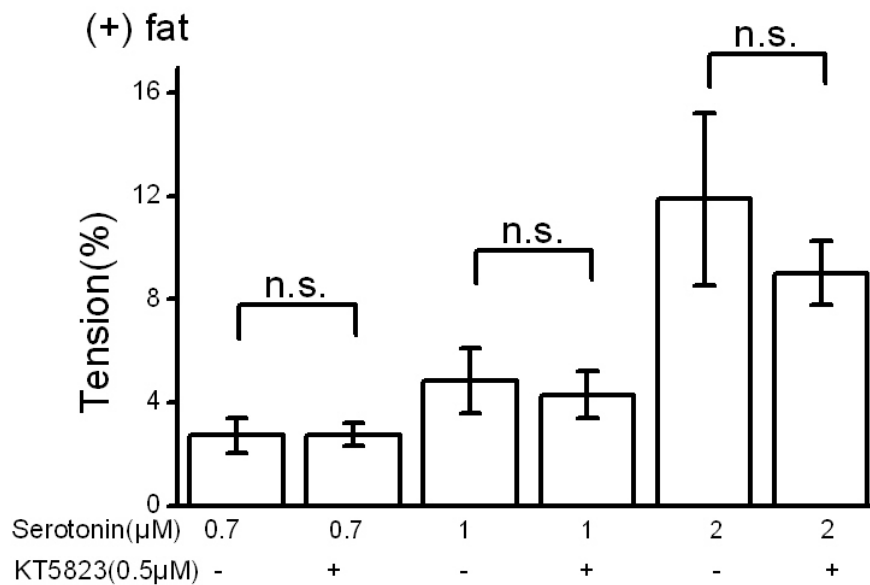
**B**

**Abb. 4.7 B:** Siehe Kommentar zu Abb. 4.7 A

#### 4.1.5 Regulation der ADRF-Freisetzung über PKG

Um die Hypothese zu prüfen, ob Proteinkinase G (PKG) eine Rolle in Freisetzung oder Wirkung von ADRF spielt, wurden Experimente nach **Protokoll 2.1** durchgeführt. Die Gefäßringe (+)fat und (-)fat wurden mit dem PKG-Blocker KT5823 (0,5 µM) inkubiert.

In **Abb. 4.8 A und B** ist zu sehen, dass KT5823 (0,5 µM) keinen Effekt auf Serotonin-abhängige (0,7 µM, 1,0 µM, 2,0 µM) Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat und (-)fat hatte. PKG war somit nicht an der Freisetzung und Wirkung von ADRF beteiligt.

**A****B**

**Abb. 4.8 A: Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat (A) und (+)fat (B) wurden nicht durch Anwesenheit von KT5823 beeinflusst ( $n=5$  jeweils,  $p \geq 0,05$ ). +, -, An- bzw. Abwesenheit der Substanzen. Serotonin wurde in einer Dosis von  $0,7 \mu\text{M}$ ,  $1,0 \mu\text{M}$  und  $2,0 \mu\text{M}$  eingesetzt. In Abwesenheit von KT5823 waren die Serotonin-abhängigen Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat schwächer als die von Gefäßringen (-)fat.**

## 4.2 Untersuchungen zur Wirkung und zum Wirkmechanismus von ADRF an der Mesenterialarterie

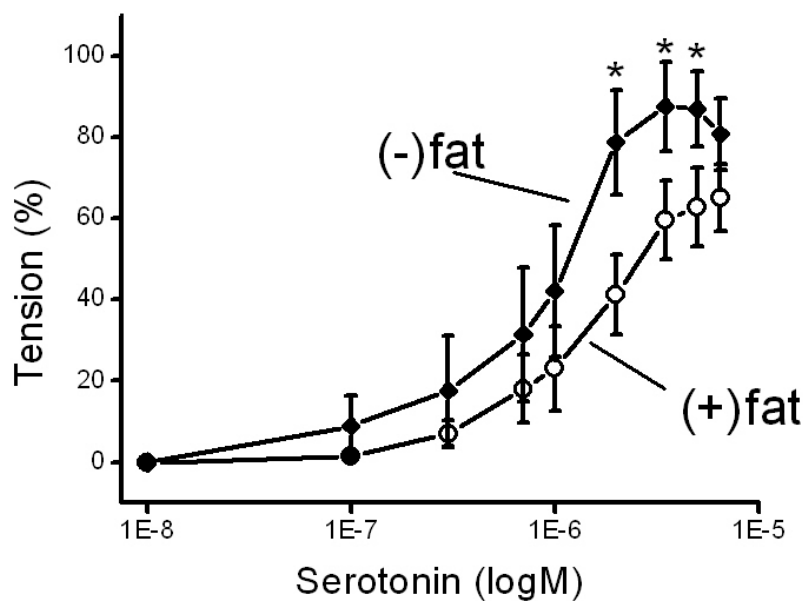
### 4.2.1 Antikontraktiler Effekt des perivaskulären Fettgewebes

Um die Hypothese zu prüfen, ob das perivaskuläre Fettgewebe der Mesenterialarterie der Ratte eine antikontraktile Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur ausübt, wurden Dosis-Wirkungskurven mit vasokontrahierenden Agonisten durchgeführt. Die Gefäßringe (+)fat und (-)fat wurden gemäß **Protokoll 1.1** mit Serotonin, Phenylephrin, Endothelin I sowie U46619 in Dosen laut **Tabelle 2.1** behandelt.

#### 4.2.1.1 Serotonin

Zuerst wurde Serotonin getestet. Serotonin wurde in Konzentrationen von 10 nM – 6,5 µM (n=6, bei 2 µM n=20) in das Organbad dazugegeben.

**Abb. 4.9** gibt graphisch wieder, dass die Gefäßringe (+)fat bei Stimulation mit unterschiedlichen Dosen Serotonin mit einer abgeschwächten kontraktile Antwort reagierten (n=6). In den Konzentrationsbereichen von 2.0 µM – 6.5 µM zeigte sich eine signifikante Abschwächung der kontraktile Antwort um nahezu 50 % ( $p < 0,05$ ).

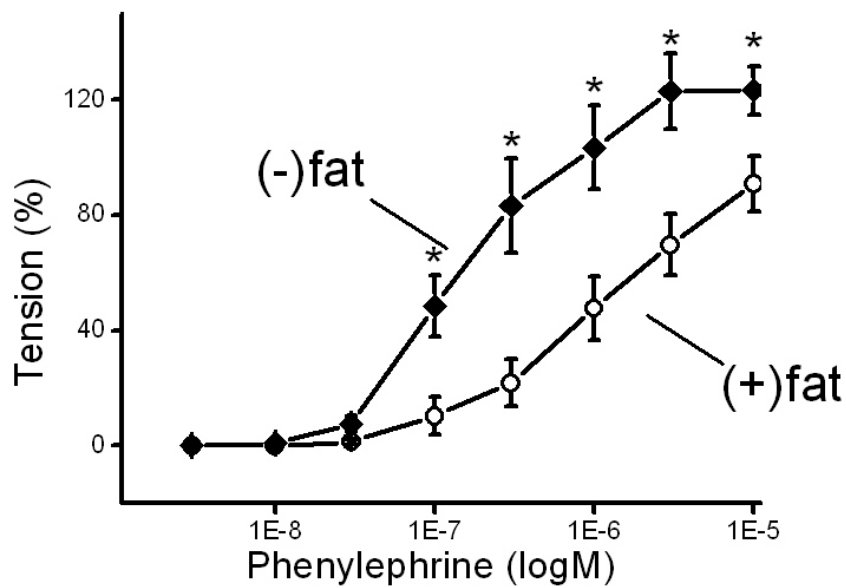


**Abb. 4.9:** Abgeschwächte kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat bei Inkubation mit Serotonin (10 nM – 6,5  $\mu$ M). Die offenen Kreise stellen die Dosis-Wirkungskurve der Gefäßringe (+)fat, die geschlossenen Rhomben die der Gefäßringe (-)fat, dar. Auf der Abszisse ist die Dosis von Serotonin aufgetragen, auf der Ordinate der Gefäßtonus bezogen auf die maximale Kontraktion bei 60 mM KCl. \*, signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.2 Phenylephrin

Phenylephrin wurde in Dosen von 100 nM bis 3  $\mu$ M ( $n=6$ ) appliziert. Es zeigte sich eine signifikant abgeschwächte kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat im Vergleich zu den Gefäßringen (-)fat ( $p < 0,05$ ). Im Konzentrationsbereich von 300 nM war eine nahezu 75 % abgeschwächte kontraktile Antwort bei den Gefäßringen (+)fat gegenüber der Vergleichsgruppe zu beobachten. Im oberen Konzentrationsbereich (3  $\mu$ M) fand wieder eine Annäherung der beiden Versuchsgruppen statt.

**Abb. 4.10** stellt die erhaltenen Ergebnisse graphisch dar.

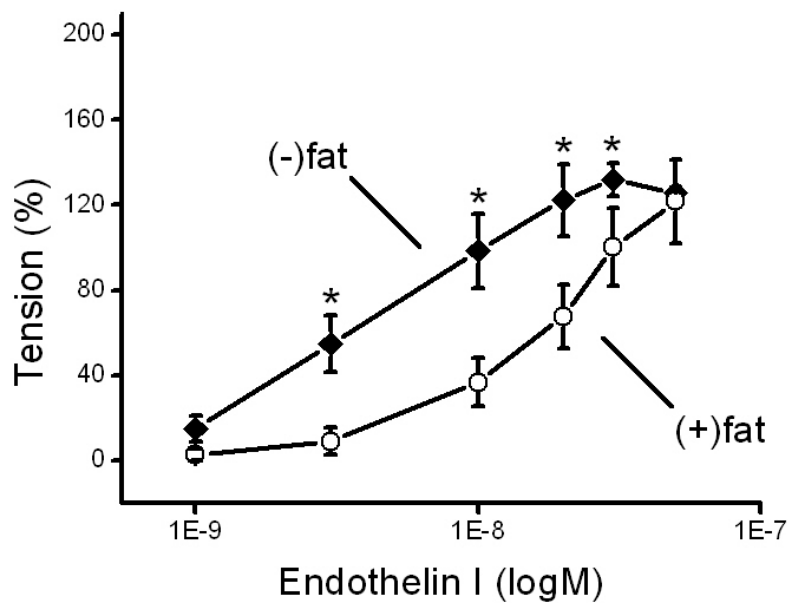


**Abb. 4.10:** Dosis-Wirkungskurve für Inkubation der Gefäßringe mit Phenylephrin. Bei Dosen von 30 nM – 10 mM zeigte sich eine signifikante Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. \*, signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.3 Endothelin I

Für Endothelin I wurde eine Dosiswirkungskurve für den Konzentrationsbereich 1 nM bis 50 nM ( $n=6$ ) mit beiden Versuchsgruppen angefertigt.

**Abb. 4.11** zeigt, dass die Gefäßringe (+)fat mit einer verminderten kontraktile Antwort auf Stimulation mit Endothelin I reagierten.

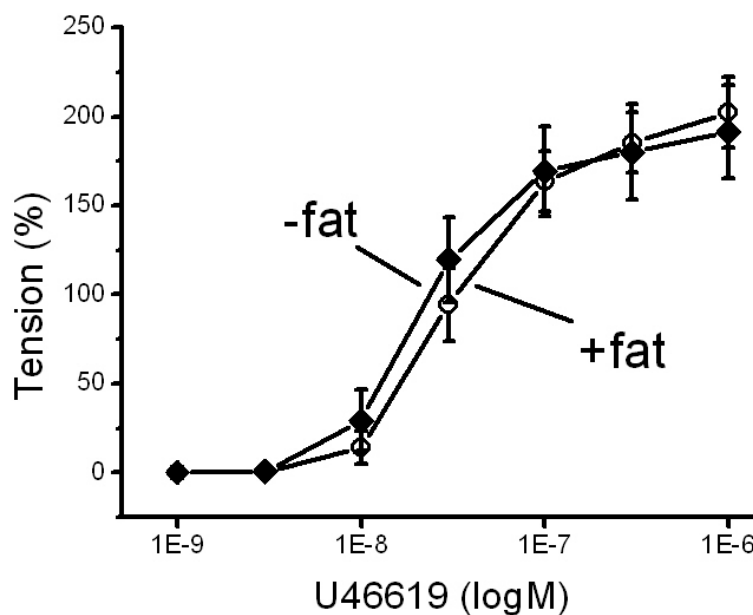


**Abb. 4.11:** Inkubation der beiden Versuchsgruppen mit Endothelin I resultierte in einer signifikanten Abschwächung der kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat. Es wurden Konzentrationen von 1 nM – 50 nM (n=6) appliziert. \*, signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.4 U46619

Die Applikation des Thromboxan- $A_2$ -(Tx- $A_2$ )-Analogons U46619 induzierte gleichstarke Kontraktion von Gefäßringen (+)fat und (-)fat im Konzentrationsbereich 1 nM – 1  $\mu$ M. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.12** graphisch dargestellt (n=6).

Die Beobachtung der gleichstarken kontraktile Antwort beider Gefäßgruppen gab Anstoß zu weiteren Untersuchungen mit diesem Wirkstoff, auf die in Abschnitt 4.2.3 näher eingegangen werden wird.



**Abb. 4.12:** Bei Inkubation mit U46619 in den Konzentrationsbereichen 1 nM – 1  $\mu$ M zeigte sich keine unterschiedliche kontraktile Antwort der Versuchsgruppen (+)fat und (-)fat ( $n=6$ ).  $p \geq 0,05$  für 1 nM – 1  $\mu$ M U 46619.

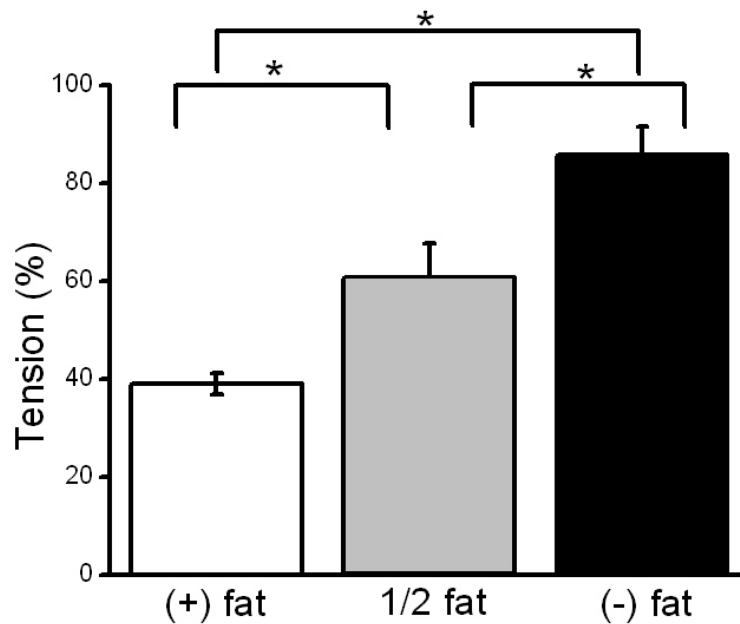
#### 4.2.2 Longitudinales Entfernen von 50% des periadventitiellen Fettgewebes

Es wurde die Hypothese getestet, ob die Menge von perivaskulärem Fettgewebe mit der Stärke des beobachteten antikontraktilen Effekts in kausalem Zusammenhang steht.

Zu diesem Zweck wurden Gefäßringe ( $\frac{1}{2}$ )fat präpariert, bei denen 50% des die Gefäßringe umgebenden Fettgewebes longitudinal entfernt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1).

In **Abb. 4.13** ist zu sehen, dass 2  $\mu$ M Serotonin ( $\frac{1}{2}$ )fat-Gefäßringe stärker als (+)fat-Ringe kontrahierte. Es ist auch zu sehen, dass 2  $\mu$ M Serotonin ( $\frac{1}{2}$ )fat -Gefäßringe schwächer als (-)fat-Gefäßringe kontrahierte. 2  $\mu$ M Serotonin kontrahierte (-)fat-Gefäßringe stärker als (+)fat-Gefäßringe. Es zeigte sich eine Beziehung zwischen der Stärke des antikontraktilen Effekts und der Menge des die Blutgefäßringe umgebenden periadventitiellen Fettgewebes.





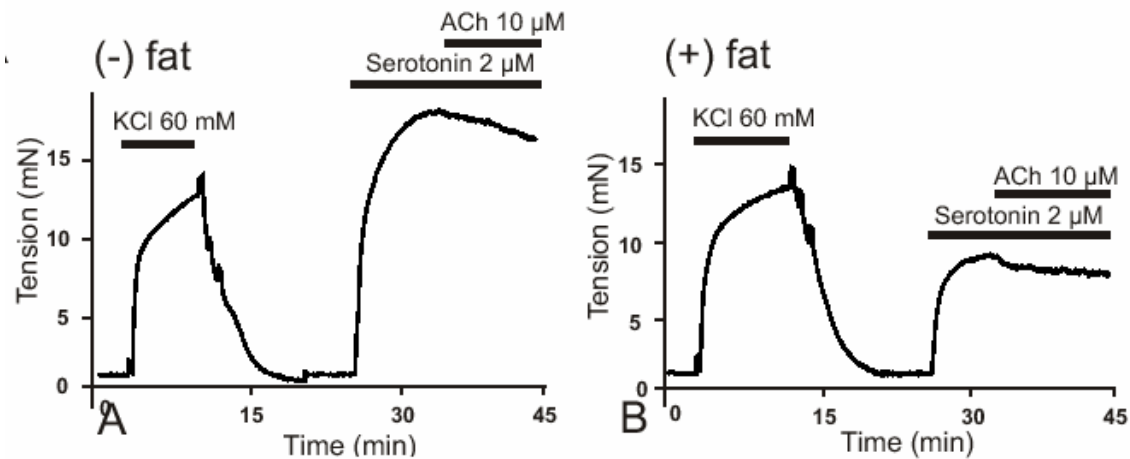
**Abb. 4.13:** Longitudinales Entfernen von 50% des periadventitiellen Fettgewebes hatte einen Einfluß auf die Kontraktionen von Gefäßringen. (1/2)fat -, (-)fat- und (+) fat-Ringe wurden mit 2  $\mu$ M Serotonin kontrahiert. Die kontraktile Antwort wurde auf die maximale Reaktion auf 60 mM KCl bezogen (jeweils n=6). \*, signifikanter Unterschied mit  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3 Ausschluss der endothelialen Vasodilatation

In Untersuchungen an der Rattenaorta konnte gezeigt werden, dass die antikontraktile Wirkung vom Fettgewebe nicht durch das Endothel vermittelt wird (Löhn *et al.*, 2002). In diesen Versuchen wurde die antikontraktile Wirkung weder durch den Blocker der NO-Synthase  $N^G$ -Nitro-L-Arginin (LNNA, 10  $\mu$ M) noch durch mechanisches Entfernen des Endothels beeinflusst.

Das Durchführen dieser Versuche an der Mesenterialarterie der Ratte konnte die Ergebnisse bestätigen. Mechanisches Entfernen des Endothels hatte keinen Einfluss auf die antikontraktile Wirkung des Fettgewebes an Mesenterialarterien der Ratte. In den Versuchen wurden (-)fat und (+)fat-Gefäßringe mittels 2  $\mu$ M Serotonin kontrahiert. Das erfolgreiche Entfernen des Endothels wurde durch Gabe von Azetylcholin (10  $\mu$ M) verifiziert.

**Abb. 4.14** zeigt einen repräsentativen Versuch.

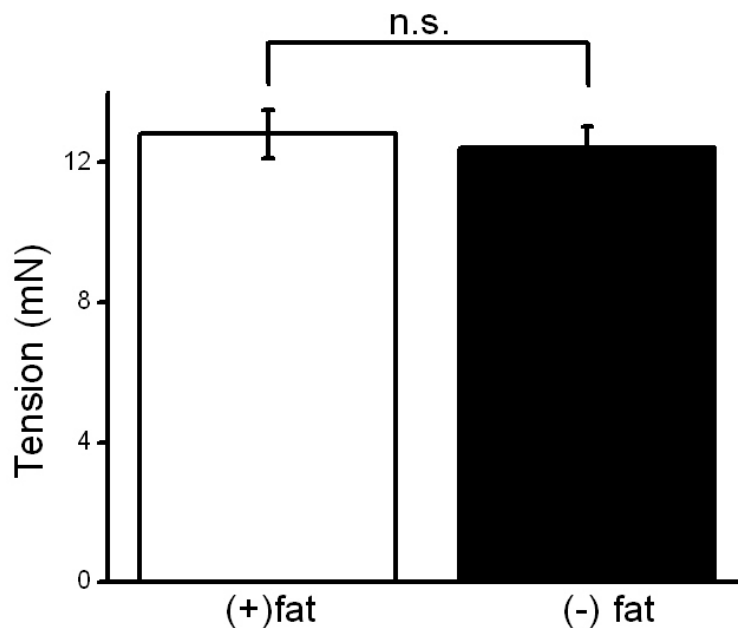


**Abb. 4.14.** Beispielerperiment für den Ausschluss der NO-Wirkung an der verminderten kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat bei Stimulation durch Serotonin (2  $\mu\text{M}$ ). Es sind zwei Gefäßringpräparationen gezeigt, bei denen das Endothel mechanisch entfernt wurde (insgesamt  $n=12$ ). Man sieht, dass trotz Entfernen des Endothels der antikontraktile Effekt des perivaskulären Fettgewebes stattfand (B). Das erfolgreiche Entfernen des Endothels wurde mit der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Azetylcholin (ACh) getestet. Das Zugeben von ACh resultierte nicht in einer Relaxation der Blutgefäßringe, die Mechanismen der endothelialen Vasorelaxation waren nicht mehr intakt.

#### 4.2.4 Die Rolle von Kaliumkanälen für den antikontraktilen Effekt des periadventitiellen Fettgewebes

Es wurde die Hypothese geprüft, ob die Aktivierung von Kaliumkanälen für den beobachteten antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde die isotonische PSS-Lösung durch eine 60 mM KCl-Lösung ausgetauscht. Die Lösung enthielt die entsprechende Molarität Kaliumionen, die im Austausch für Natriumionen zur Lösung hinzugefügt wurden.

**Abb. 4.15** zeigt, dass die Gefäßringe (+)fat und die Gefäßringe (-)fat in gleicher Weise auf die Applikation der 60 mM KCl kontraktile reagierten. Beide Gefäßgruppen kontrahierten gleichstark auf die Gabe von KCl. Die Applikation von 60 mM KCl-Lösung wurde in der Folge als initiale Evaluierung der Blutgefäßringe vor einem Experiment eingesetzt.



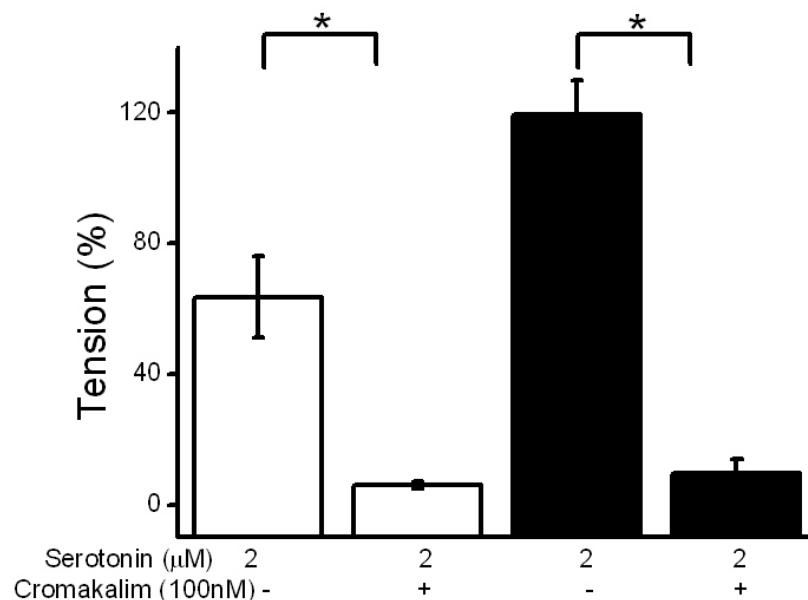
**Abb. 4.15: Gleichstarke kontraktile Antworten der Gefäßringe (+)fat und (-)fat infolge der Gabe einer 60 mM KCl-Lösung (n=29). Dargestellt ist die maximale kontraktile Antwort der Gefäßgruppen (+)fat und (-)fat nach Applikation von 60 mM KCl. Auf der Ordinate ist der gemessene Gefäßtonus in mN aufgetragen.**

Diese Beobachtung lenkte die Aufmerksamkeit auf die Beteiligung von Kaliumkanälen an der antikontraktilen Wirkung der Gefäßringpräparationen (+)fat. Wenn durch Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration das Membranpotential dem Kalium-Gleichgewichtspotential angeglichen wird und die Kaliumleitfähigkeit als dominierende Leitfähigkeit das Membranpotential bestimmt, kann eine zusätzliche Öffnung von Kaliumkanälen (z.B. durch perivaskuläres Fettgewebe) keine weitere Membranhyperpolarisation und somit Gefäßrelaxation bewirken.

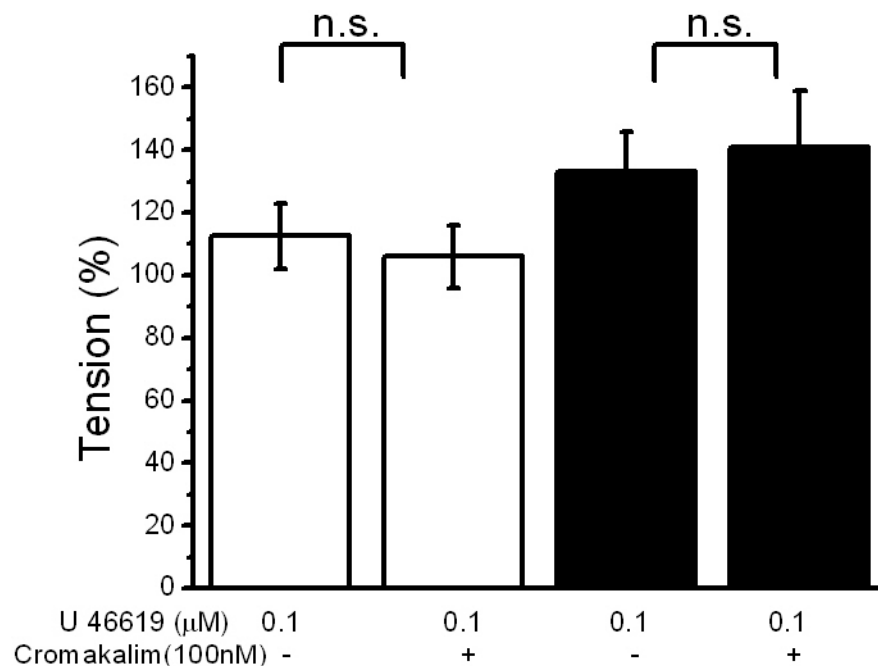
#### **4.2.5 Reaktion von U46619-kontrahierten Gefäßringen auf den Kaliumkanalöffner Cromakalim**

Um zu erforschen, warum U 46619 im Gegensatz zu Serotonin, Phenylephrin und Endothelin I in den Gefäßringen (+)fat und (-)fat keine unterschiedliche kontraktile Antwort erzeugte, kam **Protokoll 1.2** zur Anwendung.

Es wurde im vorliegenden Versuchsansatz die relaxierende Wirkung von Cromakalim auf Serotonin- und U 46619-vokontrahierte Gefäßringe (-)fat und (+)fat untersucht. **Abb. 4.16 A und B** zeigen, dass sich die durch Serotonin hervorgerufenen Kontraktionen durch Cromakalim antagonisieren ließen, nicht jedoch die durch U 46619 evozierten. U 46619-vermittelte Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat konnten nicht durch Öffnung von ATP-abhängigen und möglicherweise auch anderen Kaliumkanälen in den Gefäßmuskelzellen antagonisiert werden. Hingegen ließen sich Serotonin-vermittelte Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat relativ gut durch Öffnung von ATP-abhängigen und möglicherweise auch anderen Kaliumkanälen in den Gefäßmuskelzellen antagonisieren.

**A**

**Abb. 4.16 A:** Cromakalim relaxierte nahezu komplett Gefäßringe (-)fat und (+)fat, die mit 2  $\mu\text{M}$  Serotonin vokontrahiert wurden ( $n=5$  jeweils, paarweiser Vergleich,  $p<0,05$  jeweils). Serotonin induzierte auch stärkere Kontraktionen in Gefäßringen (-)fat als in (+)fat ( $p<0,05$ ). Die weißen Balken repräsentieren die Gefäße (+)fat, die schwarzen die Gefäße (-)fat.

**B**

**Abb. 4.16 B:** U46619 induzierte gleichstarke Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat (n=5 jeweils, paarweiser Vergleich  $p>0,05$ ). Cromakalim bewirkte keine Relaxation von Gefäßringen (-)fat und (+)fat (n=5 jeweils, paarweiser Vergleich,  $p>0,05$ ). Die weißen Balken repräsentieren die Gefäße (+)fat, die schwarzen die Gefäße (-)fat.

Gemäß der Arbeitshypothese ist der antikontraktile Effekt des perivaskulären Fettgewebes durch eine Öffnung von Kaliumkanälen und die nachfolgende Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bedingt. Die Ergebnisse in **Abb. 4.16 A und B** stehen im Einklang mit dieser Hypothese.

### **4.3 Untersuchung des an der Vermittlung des ADRF-Effektes beteiligten Kaliumkanaltyps durch Einsatz von Kaliumkanalblockern**

Es sollte die Hypothese getestet werden, ob der antikontraktile Effekt, der in den Gefäßringpräparationen (+)fat beobachtet wurde, durch Aktivierung von vaskulären, glattmuskulären Kaliumkanälen vermittelt wird. Um dies zu verifizieren, wurden verschiedene Kaliumkanalblocker eingesetzt (**Protokoll 1.3**). Es wurde erwartet,

dass durch die Blockade desjenigen Kaliumkanaltyps, der an der Vermittlung des antikontraktiven Effekts beteiligt ist, die antikontraktile Wirkung aufgehoben wird. Gemäß der Hypothese wurde angenommen, dass durch Blockade des an der Wirkung beteiligten Kaliumkanaltyps die antikontraktile Wirkung nicht mehr stattfinden kann und die Gefäßringe (+)fat und (-)fat gleichermaßen kontrahieren.

#### 4.3.1 $K_{ATP}$ -Kanäle

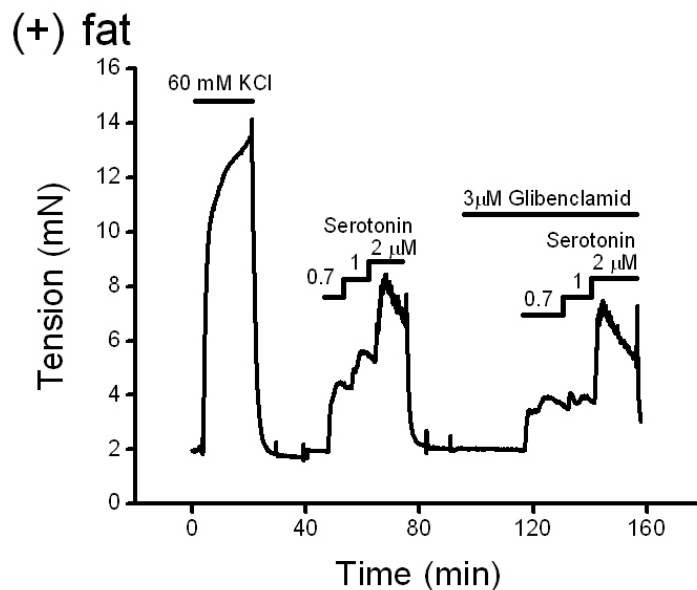
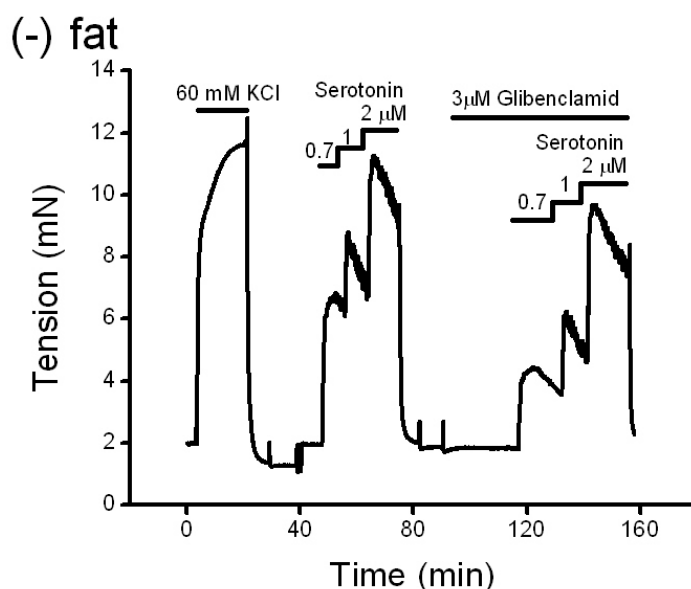
$K_{ATP}$ -Kanäle fungieren als Zielstruktur von ADRF an der Aorta (Löhn *et al.*, 2002). Daher rückte dieser Kanaltyp auch bei dieser Untersuchung zuerst in den Blickwinkel des Interesses.

Es erfolgte nach der initialen Kontraktion mit 0,7  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M Serotonin eine Applikation von 3  $\mu$ M Glibenclamid (**Protokoll 1.3**).

**Abb. 4.17 A und B** zeigen repräsentative Messergebnisse. In **Abb. 4.17 A** ist zu sehen, dass die Gabe von 60 mM KCl auf einen Gefäßring (+)fat zu einer relativ starken Gefäßkontraktion (ca. 14 mN) führte. Der Effekt war vollständig reversibel nach Auswaschen von KCl. Die nachfolgende kumulative Applikation von 0,7  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M und 2,0  $\mu$ M Serotonin bewirkte eine relativ schwache Dosis-abhängige Kontraktion (bis maximal ca. 8 mN). Dieser Effekt war vollständig reversibel nach Auswaschen von Serotonin. Die nachfolgende Gabe von 3  $\mu$ M Glibenclamid hatte keinen Effekt auf das kontraktile Verhalten des Gefäßringes. In Anwesenheit von 3  $\mu$ M Glibenclamid führte die kumulative Gabe von 0,7  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M und 2  $\mu$ M Serotonin erneut zu einer Dosis-abhängigen Gefäßkontraktion. Die Gabe von Glibenclamid führte nicht zur Verstärkung der Serotonin-abhängigen Kontraktionen.

In **Abb. 4.17 B** ist zu sehen, dass die Gabe von 60 mM KCl auf einen Gefäßring (-)fat zu einer relativ starken Gefäßkontraktion (ca. 12 mN) führte. Der Effekt war vollständig reversibel nach Auswaschen von KCl. Die nachfolgende kumulative Applikation von 0,7  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 2  $\mu$ M Serotonin bewirkte eine relativ starke Dosis-abhängige Kontraktion (bis maximal ca. 11 mN). Dieser Effekt war vollständig reversibel nach Auswaschen von Serotonin. Die nachfolgende Gabe von 3  $\mu$ M

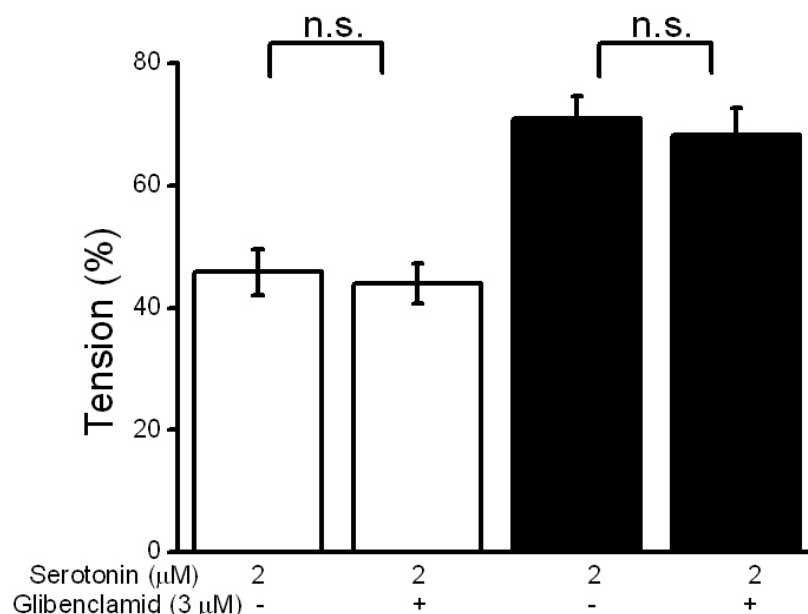
Glibenclamid hatte keinen Effekt auf das kontraktile Verhalten des Gefäßringes. In Anwesenheit von 3  $\mu\text{M}$  Glibenclamid führte die kumulative Gabe von 0,7  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{M}$  Serotonin erneut zu einer relativ starken Dosis-abhängigen Gefäßkontraktion. Die Gabe von Glibenclamid führte nicht zur Verstärkung der Serotonin-abhängigen Kontraktionen.

**A****B**

**Abb. 4.17 A und B:** Repräsentative Einzelregistrierungen mit Glibenclamid. Glibenclamid hatte keinen Effekt auf Serotonin-abhängige Kontraktionen an Gefäßringen (-)fat und (+)fat. Auf der Abszisse ist der Zeitverlauf (in Min) des Experiments aufgetragen, auf der Ordinate der Gefäßtonus (in mN). Zuerst wurde 60 mM KCl appliziert. Nach Auswaschen von KCl erfolgte die Applikation von 0,7  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  Serotonin. Nach Auswaschen von Serotonin wurde Glibenclamid

hinzugegeben ( $3 \mu\text{M}$ ), nach 15-minütiger Inkubationszeit erfolgte die erneute Applikation von Serotonin ( $0.7 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$ ).

**Abb. 4.18** zeigt die Auswertung der Experimente in Form eines Balkendiagramms. Dargestellt sind die kontraktile Antworten der Gefäßringe (+)fat und (-)fat auf Serotonin in Ab- und Anwesenheit von Glibenclamid. Es ist zu sehen, dass  $3 \mu\text{M}$  Glibenclamid keinen Effekt auf Serotonin-induzierte Kontraktionen in Gefäßringen (+)fat und (-)fat hatte. Serotonin-abhängige Kontraktionen waren in Gefäßringen (+)fat schwächer ausgeprägt als in Gefäßringen (-)fat. Glibenclamid konnte somit den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes nicht aufheben.



**Abb. 4.18:** Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat (schwarze Balken) und (+)fat (weiße Balken) durch Serotonin in An- und Abwesenheit von Glibenclamid ( $3 \mu\text{M}$ ). Glibenclamid hatte keinen Effekt auf die Serotonin-abhängigen Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat (jeweils  $n=8$  mit  $p \geq 0,05$  im paarweisen Vergleich). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat ( $p < 0,05$ ). Glibenclamid konnte somit nicht den antikontraktilen Effekt des periadventitiellen Fettgewebes aufheben. Beide Gruppen wurden mit  $2 \mu\text{M}$  Serotonin (Endkonzentration) kontrahiert. An- und Abwesenheit der Substanzen sind mit + bzw - gekennzeichnet.

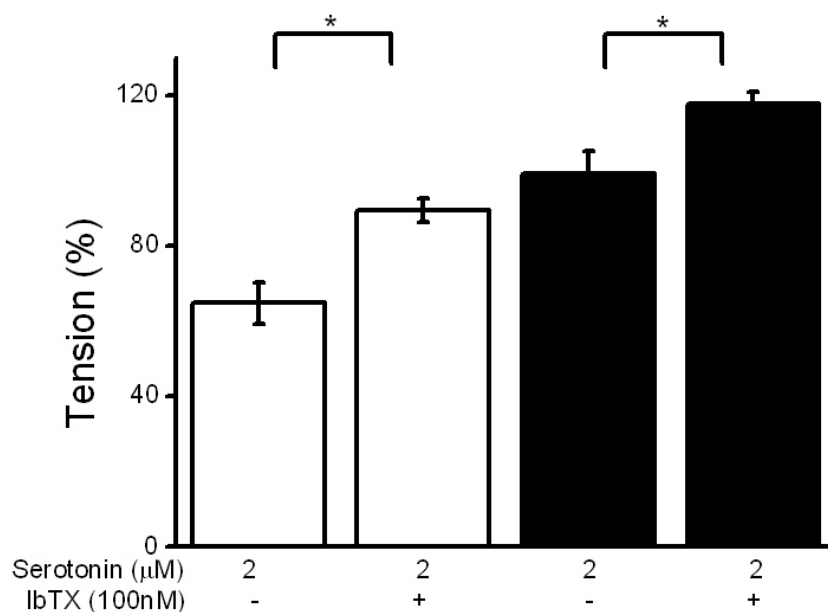


### 4.3.2 $K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle

Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Vermittlung verschiedener Effekte an die glatte Muskelzelle. Es wurden nun zwei für die Mesenterialarterie entscheidende Untergruppen dieses Kanaltyps getestet, BK- und SK-Kanäle.

#### 4.3.2.1 BK-Kanäle

Zur Überprüfung der Beteiligung der  $Ca^{2+}$ -aktivierten Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (BK-Kanäle) kam der selektive Blocker Iberiotoxin (100 nM) zum Einsatz. **Abb. 19** zeigt die Resultate der Versuche mit Iberiotoxin (100 nM, n=4). Die Applikation von Iberiotoxin bewirkte keine spezifische Inhibition des antikontraktilen Effekts der Gefäßringe (+)fat. In Anwesenheit von 100 nM Iberiotoxin reagierten sowohl Gefäßringe (+)fat als auch (-)fat mit einer stärkeren kontraktiven Antwort (ca. 20%) auf die erneute Gabe von 2  $\mu$ M Serotonin. Da die Effekte in beiden Versuchsgruppen beobachtet wurden, konnte der Effekt von Iberiotoxin nicht auf eine Inhibition des antikontraktilen Effekts des perivaskulären Fettgewebes zurückgeführt werden.



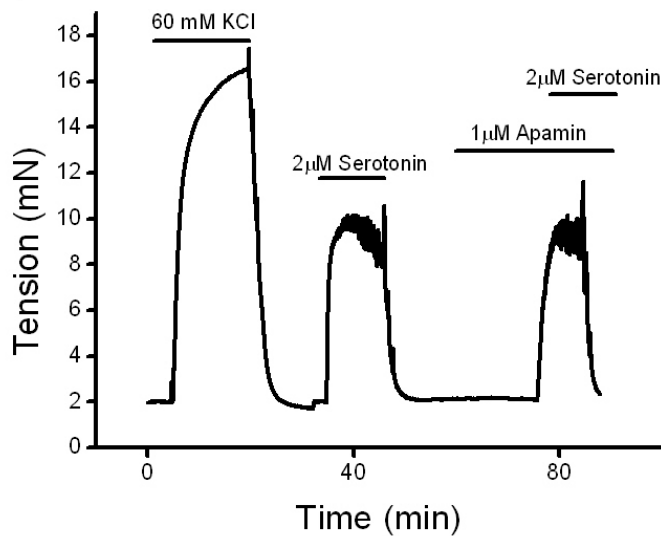
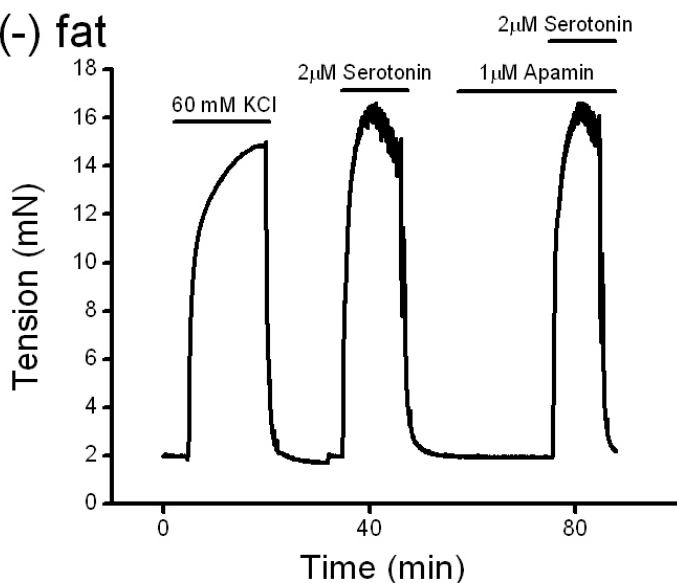
**Abb. 4.19.** Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat durch Serotonin in An- und Abwesenheit von Iberiotoxin (100 nM). Iberiotoxin führte zu einer ca. 20%igen

**Verstärkung der Serotonin-abhängigen Kontraktionen in Gefäßringen (-)fat und (+)fat (jeweils n=4 mit  $p<0,05$ , paarweiser Vergleich). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat ( $p<0,05$ ). Die weißen Balken repräsentieren die Gefäßringe (+)fat, die schwarzen Balken die Gefäßringe (-)fat. Beide Gruppen wurden mit 2  $\mu\text{M}$  Serotonin (Endkonzentration) kontrahiert. An- und Abwesenheit der Substanzen sind mit + bzw - gekennzeichnet.**

#### **4.3.2.2 SK-Kanäle**

Um zu überprüfen, ob  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle kleiner Leitfähigkeit (SK-Kanäle) in den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes involviert sind, wurden analoge Experimente mit Apamin (1  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt.

**Abb. 4.20** zeigt repräsentative Einzelmessungen. Es ist zu sehen, dass die Serotonin-abhängigen Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat nicht durch die Gabe von Apamin beeinflusst wurden. Die Applikation von Serotonin führte zu einer stärkeren Kontraktion von Gefäßringen (-)fat im Vergleich zum Gefäßringen (+)fat ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ). Sowohl bei den Gefäßringen (+)fat, als auch bei den Gefäßringen (-)fat fand keine Veränderung der kontraktilen Antwort durch Apamin statt ( $n=6$ ,  $p\geq 0,05$ ). Daraus konnte man die Vermutung ableiten, dass SK-Kanäle nicht für die abgeschwächte Kontraktion der Gefäßringe (+)fat verantwortlich waren.

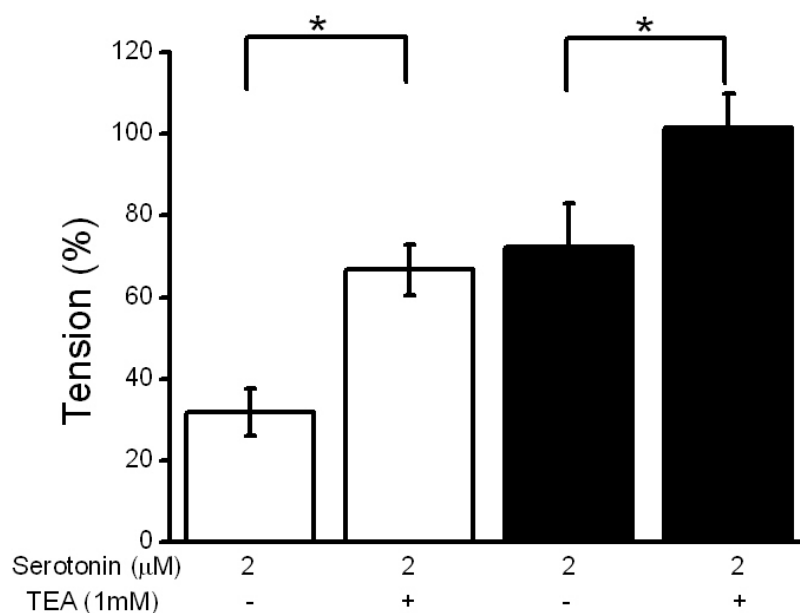
**A****(+) fat****B****(-) fat**

**Abb. 4.20 A und B: Repräsentative Einzelregistrierungen mit Apamin. Apamin hatte keinen Effekt auf Serotonin-abhängige Kontraktionen in Gefäßringen (-)fat und (+)fat. Auf der Abszisse ist der Zeitverlauf (in Min) des Experiments aufgetragen, auf der Ordinate der Gefäßtonus (in mN). Zuerst wurde 60 mM KCl appliziert. Nach Auswaschen von KCl erfolgte die Applikation von 2 μM Serotonin. Nach Auswaschen von Serotonin wurde Apamin hinzugegeben (1 μM), nach ca. 15-minütiger Inkubationszeit erfolgte die erneute Applikation von 2 μM Serotonin. Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen am Gefäßring (+)fat als am Gefäßring (-)fat.**

### 4.3.3 Unspezifische Kaliumkanalblocker

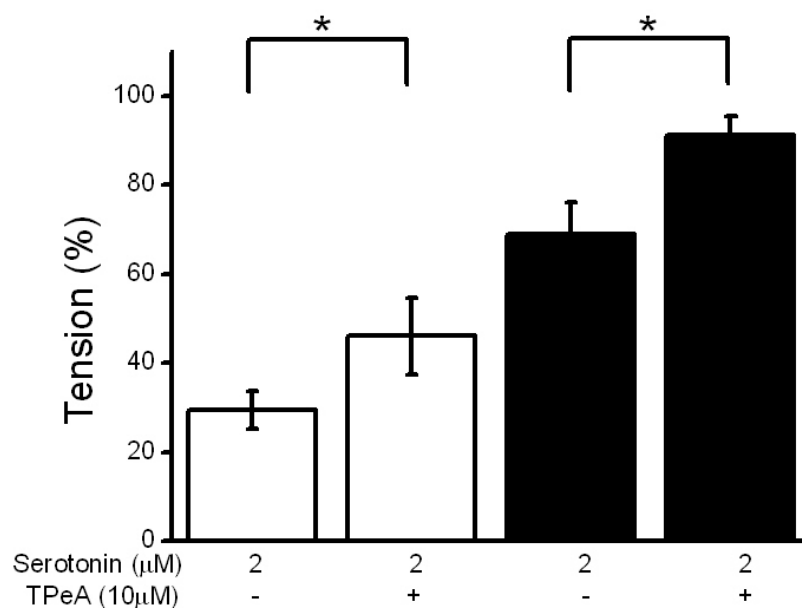
Es wurde die Wirkung des unspezifischen Kaliumkanalblockers Tetraethylammonium getestet, der in der angewendeten Konzentration BK-Kanäle blockiert.

**Abb. 4.21** zeigt die Resultate der Versuche mit TEA (1 mM, n=6). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat. In Anwesenheit von 1 mM TEA reagierten sowohl Gefäßringe (+)fat als auch (-)fat mit einer stärkeren kontraktile Antwort (ca. 30%) auf die erneute Gabe von 2  $\mu$ M Serotonin. Da die Effekte in beiden Versuchsgruppen beobachtet wurden, konnte der Effekt von TEA nicht auf eine Inhibition des antikontraktileffekts des perivaskulären Fettgewebes zurückgeführt werden.



**Abb. 4.21:** Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat durch Serotonin in An- und Abwesenheit von TEA (1 mM). TEA führte zu einer ca. 30%igen Verstärkung der Serotonin-abhängigen Kontraktionen in Gefäßringen (-)fat und (+)fat (jeweils n=6 mit  $p < 0,05$ , paarweiser Vergleich). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat ( $p < 0,05$ ). Die weißen Balken repräsentieren die Gefäßringe (+)fat, die schwarzen Balken die Gefäßringe (-)fat. Beide Gruppen wurden mit 2  $\mu$ M Serotonin (Endkonzentration) kontrahiert. An- und Abwesenheit der Substanzen sind mit + bzw - gekennzeichnet.

Es wurde noch ein weiterer BK-Kanal-Blocker getestet, Tetrapentylammonium (TPeA, 10  $\mu$ M). **Abb. 4.22** zeigt die Resultate der Versuche mit TPeA. Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat. In Anwesenheit von 1 mM TPeA reagierten sowohl Gefäßringe (+)fat als auch (-)fat mit einer stärkeren kontraktile Antwort (ca. 20%) auf die erneute Gabe von 2  $\mu$ M Serotonin. Da die Effekte in beiden Versuchsgruppen beobachtet wurden, konnte der Effekt von TPeA nicht auf eine Inhibition des antikontraktileffekts des perivaskulären Fettgewebes zurückgeführt werden.



**Abb. 4.22:** Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat durch Serotonin in An- und Abwesenheit von TPeA (10  $\mu$ M). TPeA führte zu einer ca. 20%igen Verstärkung der Serotonin-abhängigen Kontraktionen in Gefäßringen (-)fat und (+)fat (jeweils n=6 mit p<0,05, paarweiser Vergleich). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat (p<0,05). Die weißen Balken repräsentieren die Gefäßringe (+)fat, die schwarzen Balken die Gefäßringe (-)fat. Beide Gruppen wurden mit 2  $\mu$ M Serotonin (Endkonzentration) kontrahiert. An- und Abwesenheit der Substanzen sind mit + bzw - gekennzeichnet.

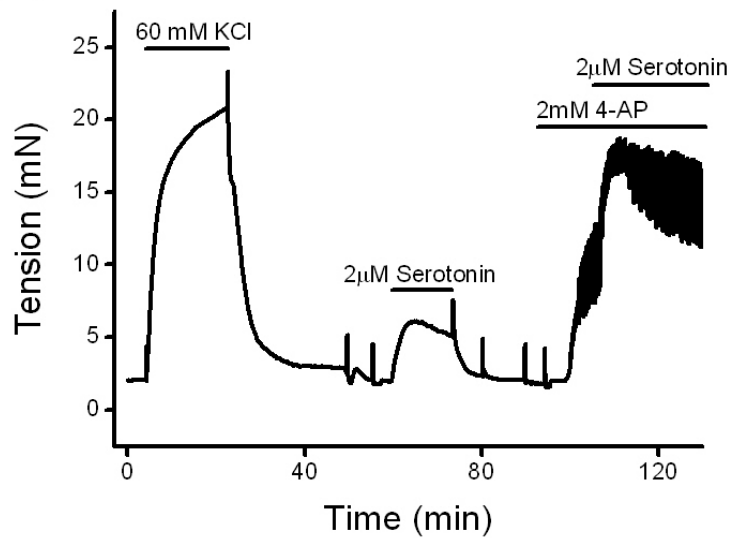
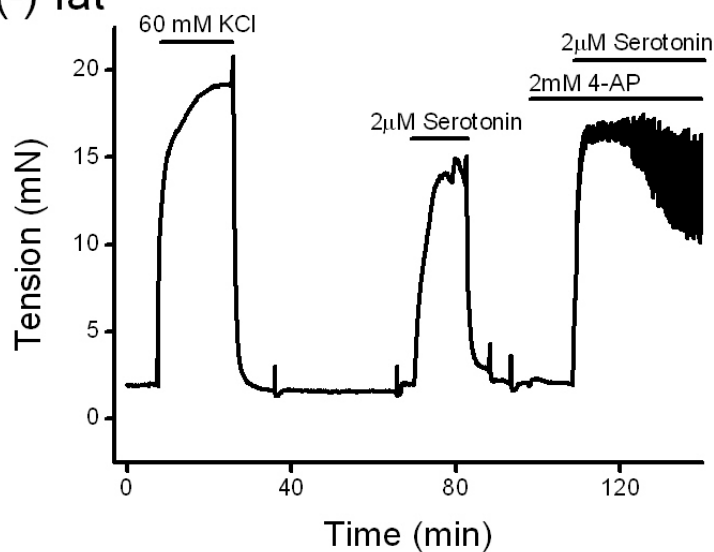
#### 4.3.4 $K_V$ -Kanäle

Um zu prüfen, ob spannungsabhängige Kaliumkanäle ( $K_V$ -Kanäle) an der Vermittlung des antikontraktilen Effekts des perivaskulären Fettgewebes beteiligt sind, wurde der  $K_V$ -Kanal-Blocker 4-AP (2 mM) eingesetzt.

**Abb. 4.23** zeigt repräsentative Einzelableitungen der durchgeführten Versuche. In **Abb. 4.23 A** ist zu sehen, dass die Gabe von 60 mM KCl auf einen Gefäßring (+)fat zu einer relativ starken Gefäßkontraktion (ca. 20 mN) führte. Der Effekt war nach Auswaschen von KCl vollständig reversibel. Die nachfolgende Applikation von 2  $\mu$ M Serotonin bewirkte eine relativ schwache Kontraktion (bis maximal ca. 5 mN). Dieser Effekt war nach Auswaschen von Serotonin vollständig reversibel. Die nachfolgende Gabe von 2 mM 4-AP hatte keinen Effekt auf das kontraktile Verhalten des Gefäßringes. In Anwesenheit von 2 mM 4-AP führte die Gabe von 2  $\mu$ M Serotonin zu viel stärkeren Gefäßkontraktion als in Abwesenheit von 4-AP.

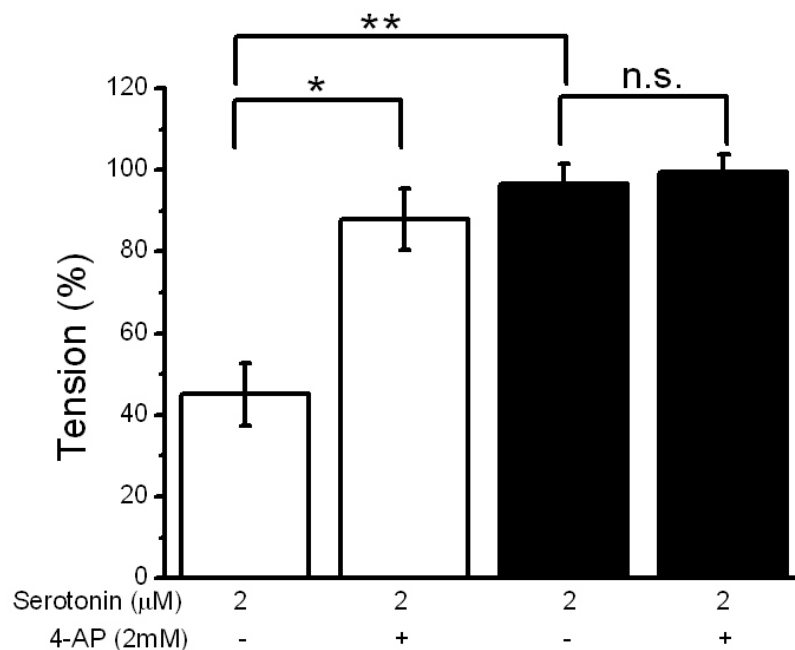
In **Abb. 4.23 B** ist zu sehen, dass die Gabe von 60 mM KCl auf einen Gefäßring (-)fat zu einer relativ starken Gefäßkontraktion (ca. 20 mN) führte. Der Effekt war nach Auswaschen von KCl vollständig reversibel. Die nachfolgende Applikation von 2  $\mu$ M Serotonin bewirkte eine relativ starke Kontraktion, d.h. bis maximal ca. 14 mN. Dieser Effekt war nach Auswaschen von Serotonin vollständig reversibel. Die nachfolgende Gabe von 2 mM 4-AP hatte keinen Effekt auf das kontraktile Verhalten des Gefäßringes. In Anwesenheit von 4-AP führte die Gabe von 2  $\mu$ M Serotonin nahezu unverändert zu einer Gefäßkontraktion auf ca. 15 mN. Die Gabe von 4-AP führte nicht zur Verstärkung der Serotonin-abhängigen Kontraktion.

Daraus konnte man den Schluss ziehen, dass der antikontraktile Effekt des perivaskulären Fettgewebes, der bei den Gefäßringen (+)fat vor Inkubation mit 2 mM 4-AP noch sichtbar war, durch Inkubation der Gefäßringe mit diesem Kaliumkanalblocker antagonisiert wurde.

**A****(+) fat****B****(-) fat**

**Abb. 4.23:** Repräsentative Kontraktionsregistrierungen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat nach Gabe von Serotonin in An- und Abwesenheit von 4-AP (2 mM). 4-AP verstärkte die Serotonin-abhängige Kontraktion des Gefäßringes (+)fat (A). Hingegen hatte 4-AP keinen Effekt auf die Serotonin-abhängige Kontraktion des Gefäßringes (-)fat (B). Serotonin induzierte geringere Kontraktionen im Gefäßring (+)fat als im Gefäßring (-)fat.

**Abb. 4.24** zeigt die Auswertung der Experimente mit 4-AP (n=6). Es ist zu sehen, dass die verminderte Serotonin-abhängige Kontraktion von Gefäßringen (+)fat durch Gabe von 2 mM 4-AP nahezu vollständig aufgehoben wurde.



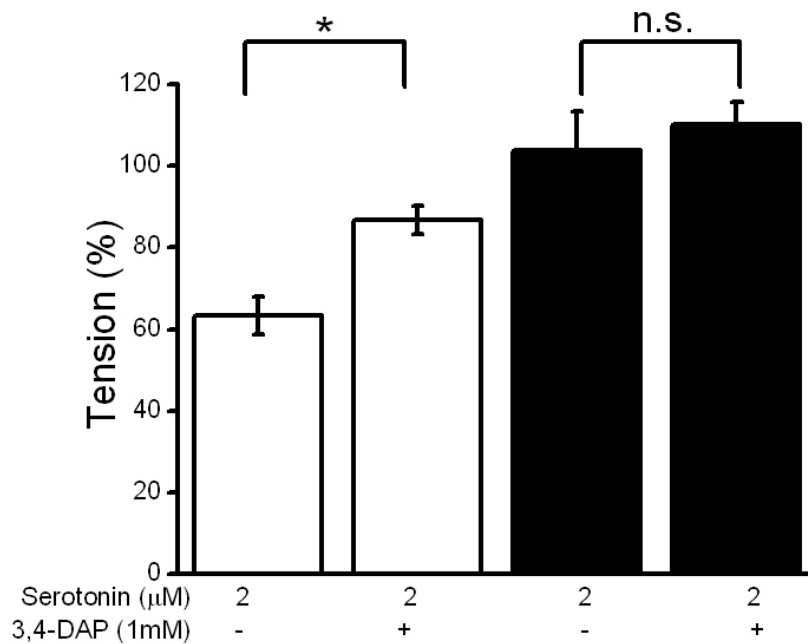
**Abb. 4.24:** Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat durch Serotonin in An- und Abwesenheit von 4-AP (2 mM). 4-AP hatte keinen Effekt auf die Serotonin-abhängigen Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat ( $n=6$ , \*, paarweiser Vergleich,  $p \geq 0,05$ ). 4-AP verstärkte Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat ( $n=6$ , \*, paarweiser Vergleich,  $p < 0,05$ ). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat ( $n=6$ , \*\*,  $p < 0,05$ ). 4-AP antagonisierte somit den antikontraktilen Effekt des periadventitiellen Fettgewebes. Die weißen Balken repräsentieren die Gefäßringe (+)fat, die schwarzen Balken die Gefäßringe (-)fat. Beide Gruppen wurden mit 2 µM Serotonin kontrahiert. An- und Abwesenheit der Substanzen sind mit + bzw - gekennzeichnet.

Um die Hypothese zu erhärten, dass  $K_V$ -Kanäle den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes vermitteln, wurde ein weiterer  $K_V$ -Kanal-Blocker getestet, 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP).

**Abb. 4.25** zeigt, dass 3,4-DAP den antikontraktilen Effekt des Fettgewebes in der Versuchsgruppe der Gefäßringe (+)fat antagonisierte. Dargestellt sind die kontraktile Antworten der Gefäßringe (+fat) und (-)fat auf Serotonin in Ab- und Anwesenheit von 3,4-DAP. Es ist zu sehen, dass 1 mM 3,4-DAP keinen Effekt auf Serotonin-induzierte Kontraktionen in Gefäßringen (-)fat hatte. Hingegen verstärkte 1 mM 3,4-DAP Serotonin-abhängige Kontraktionen in Gefäßringen (+)fat. Die Serotonin-abhängigen Kontraktionen waren in Gefäßringen (+)fat schwächer



ausgeprägt als in Gefäßringen (-)fat. 3,4-DAP hob somit den antikontraktilen Effekts des perivaskulären Fettgewebes auf.



**Abb. 4.25: Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat und (+)fat durch Serotonin in An- und Abwesenheit von 3,4-DAP (1 mM). 3,4-DAP hatte keinen Effekt auf die Serotonin-abhängigen Kontraktionen von Gefäßringen (-)fat (n=6, paarweiser Vergleich,  $p>0,05$ ). 4-AP verstärkte Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat (n=6,  $p<0,05$ ). Serotonin induzierte schwächere Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat als von Gefäßringen (-)fat ( $p<0,05$ ). Die weißen Balken repräsentieren die Gefäßringe (+)fat, die schwarzen Balken die Gefäßringe (-)fat. Beide Gruppen wurden mit 2 µM Serotonin kontrahiert. An- und Abwesenheit der Substanzen sind mit + bzw - gekennzeichnet.**

## **5            *Diskussion***

### **5.1            Untersuchung des Freisetzungsmechanismus von ADRF an der Aorta**

#### **5.1.1            Kalziumabhängigkeit der ADRF-Freisetzung**

Um die Mechanismen der Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta der Ratte zu charakterisieren, wurden Bioassay-Experimente durchgeführt. Die Inkubation von Gefäßringen (+)fat mit kumulativen Dosen Kalzium in der Organbadflüssigkeit und die Applikation dieser Lösung auf die Gefäßringe (-)fat zeigten, dass die Freisetzung von ADRF ein kalziumabhängiger Prozess ist. Es ließ sich eine steile Beziehung zwischen ADRF-Freisetzung und Kalziumkonzentration bei physiologischer extrazellulärer Kalziumkonzentration nachweisen. Die halbmaximale ADRF-Freisetzung war bei 4.7 mM extrazellulärer Kalziumkonzentration gegeben.

Löhn et al. konnten zeigen, dass das periadventitielle Fettgewebe von isolierten Ringsegmenten der Aorta der Ratte einen antikontraktilen Effekt auf die Stimulation der Gefäßringe mit vasokonstriktorisches Substanzen ausübt. In Bioassay-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt durch einen humoralen, transferablen Faktor bedingt ist, der vom periadventitiellen Fett produziert wird und in die Organbadflüssigkeit freigesetzt wird (Löhn et al., 2002). Es zeigte sich, dass diese Substanz relativ stabil ist und bei Transfer auf (-)fat-Ringe ähnliche antikontraktile Effekte ausübt. (Löhn et al., 2002).

In dieser Arbeit konnte erstmals die Hypothese bekräftigt werden, dass der Effekt von ADRF vollständig reversibel ist. Applikation von Aliquots der Organbadflüssigkeit aus (+)fat-Donorgefäßringen auf (-)fat-Akzeptorgefäßringe führte zu einer dosisabhängigen Relaxation, die durch Ersetzen der Flüssigkeit durch normale PSS komplett reversibel war. Diese Ergebnisse bestätigen die Vorbefunde von Löhn et al.,

dass ADRF ein eigenständiger, transferabler Faktor ist, der seine Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur ausübt.

In einer aktuellen Arbeit von Dubrovskaja et al. (Dubrovskaja *et al.*, 2003) konnten außerdem weitergehende Erkenntnisse über die Identität von ADRF gewonnen werden. In Versuchen bezüglich der Freisetzung von ADRF aus den perivaskulären Adipozyten konnte nachgewiesen werden, dass Freisetzung und Wirkung von ADRF nicht von Vanilloid-, Cannabinoid- CB1/CB2 und CGRP-Rezeptoren abhängig ist. Durch den Einsatz von spezifischen Antagonisten ließ sich belegen, dass die antikontraktile Wirkung von ADRF nicht verändert war (Dubrovskaja *et al.*, 2003). Auch die Inhibition von neuronalen N-Typ-Kalziumkanälen und spannungsabhängigen Natriumkanälen veränderte nicht die Freisetzung oder die Wirkung von ADRF.

### **5.1.2 Die Rolle intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle für die Freisetzung von ADRF an der Aorta**

Auf den Vorbefunden über die Transferabilität des Faktors aufbauend, stellte sich die Frage, welche Mechanismen in die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe involviert sind. Es wurden wichtige intrazelluläre Signaltransduktionswege untersucht. Man untersuchte, ob durch Inkubation der Gefäßringe (+)fat und (-)fat mit einem spezifischen Antagonisten der PKA (H-89), Tyrosinkinase (AG82, Genistein, Daidzein, ST-638) und PKG (KT5823) eine Änderung des antikontraktilen Effekts des periadventitiellen Fettgewebes resultierte. Um in der Folge differenzieren zu können, ob dem veränderten antikontraktilen Effekt eine veränderte Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe oder eine veränderte Wirkung des Faktors an der glatten Gefäßmuskulatur zugrunde liegt, wurde mittels Bioassay-Experimenten zwischen freisetzender [Donor, (+)fat] und empfangender Seite [Akzeptor, (-)fat] unterschieden.

#### **5.1.2.1 PKA**

Um die Hypothese zu prüfen, ob die Freisetzung von ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe der Ratte ein PKA-abhängiger Prozess ist, wurde der spezifische

Antagonist der PKA H-89 angewendet. Es zeigte sich, dass die Inkubation der Gefäßringe (+)fat mit H-89 (9  $\mu$ M) eine signifikante Reduktion des antikontraktilen Effekts, also eine signifikant stärkere kontraktile Antwort auf Stimulation mit Serotonin (2  $\mu$ M) zur Folge hatte. Die Durchführung des gleichen Experiments an den Gefäßringen (-)fat zeigte keine Änderung in der kontraktile Antwort. Das führte zur Bestätigung der Annahme, dass die Freisetzung von ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe der Ratte ein Prozess ist, der vom intrazellulären Signaltransduktionsweg der PKA abhängig ist.

An dieser Stelle konnte jedoch noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta durch Blockade von PKA supprimiert wurde, oder ob die glattmuskuläre PKA und damit die Wirkung von ADRF an den VSMC der Aorta betroffen war. Um dies zu differenzieren, wurden Bioassay-Experimente durchgeführt, durch die zwischen Freisetzung und Wirkung von ADRF unterschieden werden konnte. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz des PKA-Antagonisten H-89 (9  $\mu$ M) die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe unterdrückte.

In glatten Gefäßmuskelzellen stellt die Aktivierung der PKA einen Schlüsselmechanismus der  $\beta$ -adrenergen, agonistengesteuerten Vasorelaxation dar. Das Signal von  $\beta_1/\beta_2$ -Rezeptoren führt zu einer Aktivierung von stimulatorischen G-Proteinen ( $G_s$ ), einer Aktivierung der Adenylatzyklase, zur Produktion von zyklischem AMP (cAMP) und subsequenter Aktivierung der PKA (Carvajal *et al.*, 2000).

Auch für verschiedene endogene Peptide, die nicht über den adrenergen Weg wirken, spielt eine Aktivierung der PKA im glatten Muskel eine wichtige Rolle. Für Adenosin ist erforscht, dass es den glatten Gefäßmuskel über Hyperpolarisation der Zellmembran relaxiert. Dieser Effekt ist zumindestens zum Teil einer Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen zuzuschreiben (Kleppisch *et al.*, 1995a). Kleppisch und Nelson betrachten die Stimulation der cAMP-abhängigen PKA als das Bindeglied zwischen Adenosin A<sub>2</sub>-Rezeptor und  $K_{ATP}$ -Kanal. Vor allem Prostazyklin entfaltet seine Wirkung über Erhöhung der cAMP-Konzentration. Stimulation des Prostazyklin-Rezeptors in der Zellmembran der VSMC führt zu Erhöhung von cAMP, das wiederum seine Effekte bezüglich der Reduktion des intrazellulären Kalziums

entfaltet (Parkington *et al.*, 1993). Die glattmuskuläre PKA ist jedoch nach den hier gewonnenen Ergebnissen nicht für die ADRF-Wirkung verantwortlich.

In Adipozyten sind die Rezeptoren des adrenergen Systems exprimiert (Klein *et al.*, 1999). Auch hier findet man den „klassischen“ Weg der PKA-Aktivierung von  $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung, G-Protein- und Adenylatzyklen-Aktivierung, Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und schließlich Aktivierung der PKA. Auch für die  $\beta_3$ -adrenerge Aktivierung von Transkriptionsfaktoren in braunen Adipozyten ist eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von Bedeutung (Lindquist *et al.*, 2000). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression des potenten angiogenetischen Faktors Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Primärkulturen brauner Adipozyten der Ratte durch PKA vermittelt wird (Fredriksson *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit konnte die Hypothese bekräftigt werden, dass die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe durch Aktivierung der PKA vermittelt wird. An dieser Stelle können jedoch noch keine Aussagen über die vorgeschalteten Rezeptoren gemacht werden, auch nicht über die nachfolgenden Wege. Ein Regulationsmechanismus analog zur adrenergen Signaltransduktion, der zur subsequenten Aktivierung der PKA und dadurch Produktion und Freisetzung von ADRF führt, ist jedoch denkbar.

#### **5.1.2.2 Tyrosinkinase**

Löhn *et al.* konnten zeigen, dass Inkubation von Ringsegmenten der Aorta mit dem Blocker der Tyrosinkinase Genistein die antikontraktile Wirkung des Fettgewebes blockierte. Sie vermuteten, dass die antikontraktile Wirkung von perivaskulärem Fettgewebe über den Signaltransduktionsweg der Tyrosinphosphorylierung geschieht (Löhn *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Inkubation der Gefäßringe (+)fat mit dem Inhibitor der Tyrosinkinase Tyrphostin A25 (AG 82, 10  $\mu$ M) den antikontraktilen Effekt des periadventitiellen Fettgewebes reduzierte. Inkubation der Gefäßringe (-)fat mit dem Wirkstoff resultierte in keiner Änderung der kontraktilen

Antwort auf Stimulation mit Serotonin (2  $\mu$ M). Tyrphostin ist ein strukturell dem Genistein nicht verwandter Inhibitor der Tyrosinkinase (Yan *et al.*, 2002).

In Bioassay-Versuchen konnte daraufhin nachgewiesen werden, dass die veränderte kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat nach Applikation von 2  $\mu$ M Serotonin auf eine Inhibition der Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe und nicht auf eine verminderte Wirksamkeit von ADRF am glatten Gefäßmuskel zurückzuführen ist. Das bestätigte die Vermutung, dass die intrazellulären Signaltransduktionswege der Tyrosinphosphorylierung an der Freisetzung von ADRF aus dem perivaskulären Fettgewebe beteiligt sind.

Um die Beteiligung der Tyrosinkinase an der Freisetzung von ADRF näher zu beleuchten, wurden vergleichende Experimente mit aktiven und inaktiven Tyrosinkinaseinhibitoren unter Stimulation mit Phenylephrin durchgeführt. In den Ergebnissen zeigte sich, dass der aktive Inhibitor der Tyrosinkinase Genistein den antikontraktilen Effekt des Fettgewebes bei den Gefäßringen (+)fat, die mit 100 nM Phenylephrin vorkontrahiert wurden, blockierte. Die inaktiven Tyrosinkinaseinhibitoren waren dazu nicht in der Lage.

Diese Befunde sind eine weitere Verstärkung der Hypothese, dass die beobachtete antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes durch Beteiligung des Signaltransduktionswegs der Tyrosinkinase vermittelt wird. Aufgrund dieser Ergebnisse und vor allem aufgrund der Ergebnisse aus den Bioassay-Experimenten ist es wahrscheinlich, dass die Tyrosinkinase eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe spielt.

In Adipozyten besitzt die Tyrosinkinase vielfältige Funktionen. Tyrosinphosphorylierung durch Tyrosinkinase ist in die insulinabhängige Glukoseaufnahme in Fettzellen involviert (Klein *et al.*, 1999). Tyrosinkinase spielt eine Rolle bei der Norepinephrin-induzierten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Lindquist *et al.*, 2000). Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der Tyrosinkinase bei der Freisetzung von ADRF. Eine Interaktion von PKA und Tyrosinkinase ist denkbar, da gezeigt werden konnte, dass die Inhibierung von PKA und Tyrosinkinase durch H-89 (9  $\mu$ M) und Tyrphostin A 25 (AG 82, 10  $\mu$ M) nicht additiv ist (Dubrovskaja *et al.*, 2003). Beide Signaltransduktionswege scheinen also an

der Freisetzung von ADRF unabhängig voneinander, bzw. gleichzeitig, beteiligt zu sein.

### **5.1.2.3      PKG**

Um die Beteiligung des Signaltransduktionsweges der PKG zu prüfen, wurde der selektive Antagonist KT5823 (1  $\mu$ M) eingesetzt. In den Ergebnissen zeigte sich, dass die Inkubation der Gefäßringe (+)fat und (-)fat keine signifikante Änderung der kontraktilen Antwort auf Stimulation mit Serotonin (2  $\mu$ M) ergab.

Durch Blockade der PKG konnte der antikontraktile Effekt bei den Gefäßringpräparationen (+)fat nicht aufgehoben werden. Es konnte keine signifikante Modifikation der kontraktilen Antwort durch Inkubation mit KT5823 erzielt werden.

Es lässt sich daraus der Schluss ziehen, dass der intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismus der PKG nicht an der Wirkung oder Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta der Ratte beteiligt ist.

**Abb. 5.1** stellt die gewonnenen Ergebnisse schematisch dar.

## Endothelium

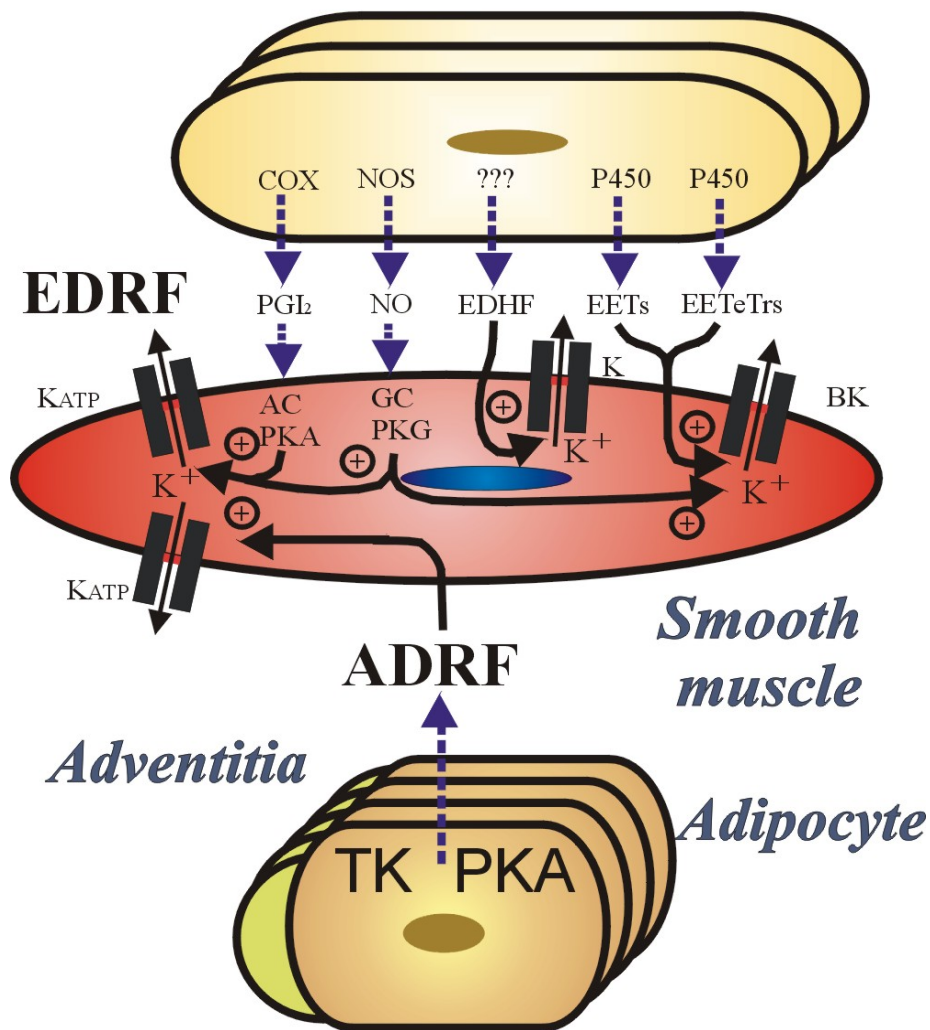


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta. Über die Beteiligung von Tyrosinkinase und von PKA wird vermutlich die Freisetzung von ADRF reguliert. Die relaxierende Wirkung von ADRF an der Glattmuskelzelle scheint nicht von der Beteiligung von Tyrosinkinase und von PKA abzuhängen. Vgl. Abb. 2.2.



## **5.2 Antikontraktiler Effekt des periadventitiellen Fettgewebes auf die Mesenterialarterie der Ratte**

### **5.2.1 Dosisabhängigkeit der Kontraktilität**

Das periadventitielle Fettgewebe der Mesenterialarterie der Ratte übt einen antikontraktilen Effekt auf die Gefäßringe (+)fat aus. In isometrischen Kontraktionsmessungen konnte eine signifikant abgeschwächte kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat auf die vasoaktiven Hormone Serotonin, Phenylephrin und Endothelin I nachgewiesen werden. Der antikontraktile Effekt des periadventitiellen Fettgewebes ist hier zum ersten Mal für Arterien des mesenterialen Strombettes der Ratte gezeigt worden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Lohn et al. (Lohn *et al.*, 2002) und Soltis et al. (Soltis *et al.*, 1991), die aufweisen konnten, dass es Unterschiede in der kontraktile Antwort für Gefäßringpräparationen (+)fat und (-)fat der Aorta der Ratte gibt.

Lohn et al. beobachteten in ihren initialen Studien zu ADRF an der Aorta der Ratte bereits, dass die Gefäßringe (+)fat der Aorta der Ratte eine signifikant abgeschwächte kontraktile Antwort auf die vasokonstriktorisches Agonisten Serotonin, Angiotensin II und Phenylephrin hatten.

Hierbei ergaben sich jedoch Differenzen in der Stärke des beobachteten Effekts zu den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen (Lohn *et al.*, 2002). Während die Abschwächung der maximalen Kontraktion der Aorta bei Kontraktion mit Serotonin 80 % betrug, konnte an der Mesenterialarterie nur eine um ca. 40 % schwächere Kontraktion beobachtet werden. Das lässt vermuten, dass es Unterschiede in Mechanismus und Art des antikontraktilen Effekts geben könnte.

Die Untersuchungen von Lohn et al. wurden an der Aorta der Ratte durchgeführt, die als großlumiges Blutgefäß nicht direkt an der Regulation des TPR beteiligt ist. Die Aorta ist anatomisch-funktionell ein Windkesselgefäß und primär für die Verteilung der Blutströmung verantwortlich (Aalkjaer *et al.*, 1983; Angus, 2000). Bis zu der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von ADRF noch nicht an einem Blutgefäß beschrieben, dass anatomisch-funktionell über die Komponente des TPR an der Blutdruckregulation teilnimmt. Die Gefäße der mesenterialen Strombahn sind ein

solches Gefäßstromgebiet (Christensen *et al.*, 2001). Die Eigenschaft, zugleich an der Kontrolle des Blutflusses in Ruhe sowie unter veränderten Bedingungen teilzunehmen, erfüllen am ehesten Mesenterialarterien, die aktiv und passiv an der Aufrechterhaltung und Kontrolle der intestinalen Durchblutung teilnehmen (Christensen *et al.*, 2001).

Die anatomisch-physiologischen Unterschiede zwischen Aorta und Mesenterialarterien zeigen sich in der unterschiedlichen Expression von Rezeptoren und Kanalproteinen der VSMC (Bradley *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 1995). Ebenso spiegeln sich diese Unterschiede in den verschiedenen Eigenschaften des die jeweiligen Gefäße umgebenden Fettgewebes wider (Cinti *et al.*, 2000). Auf den Sachverhalt der unterschiedlichen Expression von Kaliumkanälen wird im Folgenden näher eingegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass es eine Korrelation zwischen der Menge des perivaskulären Fettgewebes und des beobachteten antikontraktilen Effekts gibt. In den Präparationen (1/2)fat zeigte sich ein nicht so stark ausgeprägter antikontraktiler Effekt des perivaskulären Fettgewebes wie bei den Gefäßringen (+)fat. Es war jedoch eine signifikante Abschwächung des antikontraktilen Effekts gegenüber den Gefäßringen (-)fat zu beobachten. Das bestätigt zum Einen, dass das perivaskuläre Fett keine mechanische Barriere für die in das Badvolumen applizierten Wirkstoffe darstellt. Zum Anderen belegen diese Ergebnisse, dass es eine direkte Beziehung zwischen der Menge des perivaskulären Fettgewebes und der Stärke des antikontraktilen Effekts gibt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Endothel nicht für den an der Mesenterialarterie gefundenen antikontraktilen Effekt verantwortlich ist. Diese Ergebnisse bestätigten die an der Aorta gefundenen Resultate und zeigten den Weg auf für die weitere Charakterisierung eines vom perivaskulären Fettgewebe ausgehenden antikontraktilen Faktors, unabhängig von den bereits charakterisierten Faktoren der endothelabhängigen Vasodilatation.

### 5.2.2 Die Rolle von Kaliumkanälen

Die Inkubation der Gefäßringe (+)fat und (-)fat mit 60 mM KCl-Lösung wies keine Unterschiede in der kontraktile Antwort zwischen beiden Gruppen auf. Die Gefäßringe reagierten in gleicher Weise kontraktile, ohne die bei Applikation mit vasokontrahierenden Hormonen aufgetretenen Unterschiede.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Soltis et al. (Soltis *et al.*, 1991), sowie Lohn et al. (Lohn *et al.*, 2002) bei ihren Untersuchungen der Aorta der Ratte. Soltis et al. fanden ebenfalls die gleiche kontraktile Antwort auf die Applikation hoch konzentrierter Kaliumchloridlösungen in den Gefäßringen (+)fat und (-)fat. Sie deuteten ihre Befunde mit einer verstärkten Wiederaufnahme von Substraten des adrenergen Nervensystems durch sympathische Nervenendigungen und eine dadurch abgeschwächte Wirkung des sympathisch-adrenergen Nervensystems (Soltis *et al.*, 1991). Lohn et al. konnten zeigen, dass der antikontraktile Effekt der Gefäßringe (+)fat durch ADRF vermittelt ist. Die antikontraktile Wirkung entfaltete ADRF vermutlich über die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen der glatten Gefäßmuskulatur.

Durch Anheben der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 60 mM wird die Zellmembran von Gefäßmuskelzellen auf ca. -20 mV depolarisiert (Gollasch *et al.*, 1996) und der Unterschied zwischen  $K^+$ -Gleichgewichtspotential und Ruhemembranpotential minimiert. Ein Kaliumkanalöffner kann die Gefäßmuskelzellen bei externen Kaliumkonzentrationen von > 40mM nicht mehr hyperpolarisieren, da sich der elektrochemische Gradient verschoben hat (Standen *et al.*, 1989). Betrachtet man die erheblichen Differenzen der kontraktile Antwort auf die vasokonstriktischen Agonisten vor dem Hintergrund der gleichartigen kontraktile Antwort der Gefäßringe (+)fat und (-)fat auf Applikation von 60 mM KCl-Lösung, so bestätigt das die Hypothese, dass der beobachtete Effekt auch an der in dieser Arbeit untersuchten Mesenterialarterie der Ratte durch einen Kaliumkanal-Öffner vermittelt ist.

Die in beiden Gefäßgruppen [(+)fat und (-)fat] gleich ausgeprägte kontraktile Antwort auf Applikation von 60 mM haltiger KCl-Lösung diente auch als Gradmesser für die Lebendigkeit des Gewebes und bestätigte, dass die Gefäßringe keine Schäden bei

der Präparation genommen hatten. Die kontraktile Antwort auf Applikation von 60 mM KCl fungierte als Bezugspunkt zur Normalisierung der Messwerte und damit zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Untersuchungsgruppen (+)fat und (-)fat. Die Kaliumlösung induzierte in beiden Untersuchungsgruppen gleichstarke Kontraktionen. Auf dieser Basis war die Normierung aller Messwerte auf die 60 mM KCl-induzierten Kontraktionskraftwerte möglich.

### 5.2.3 U46619 und Cromakalim

Bei Erstellen der Dosis-Wirkungskurve mit dem Thromboxan-A<sub>2</sub>-Analogon U46619 fiel auf, dass es keine Unterschiede in der kontraktilen Antwort der Gefäßringe (+)fat und (-)fat auf Inkubation mit dem Wirkstoff gab. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Serotonin, Phenylephrin und Endothelin kam es bei U46619 nicht zu einer abgeschwächten kontraktilen Antwort des perivaskulären Fettgewebes.

Cromakalim ist ein Kaliumkanalöffner, der maximale Relaxation durch Öffnen von K<sub>ATP</sub>-Kanälen verursacht (Cohen *et al.*, 1995; Gollasch *et al.*, 1995; McCarron *et al.*, 1991). McPherson *et al.* (McPherson *et al.*, 1991) haben für Koronararterien des Hundes gezeigt, dass durch U46619 kontrahierte Gefäßringe nicht mit Cromakalim relaxiert werden konnten. Im Gegensatz dazu ließen sich mit Phenylephrin und Serotonin kontrahierte Gefäßringe durch Applikation von Cromakalim wie erwartet relaxieren. Die Autoren deuteten diese Unterschiede mit der größeren kontraktilen Kraft, die U46619 im Gegensatz zu anderen vasokonstriktorisches Agonisten entfaltet (McPherson *et al.*, 1991).

In einer aktuellen Studie konnten Crane und Garland zeigen, dass Inkubation von isolierten Mesenterialarterien der Ratte mit U46619 zu einem Verlust der EDHF-evozierten Hyperpolarisation führt (Crane *et al.*, 2004). Die Autoren deuteten dies mit einer Inaktivierung von SK-Kanälen im Endothel. Andere Autoren konnten bereits zeigen, dass U46619 Kaliumkanäle in der Koronararterie des Schweins blockiert (Scornik *et al.*, 1992). Eine genaue Untersuchung, welcher Kaliumkanaltyp blockiert wird, wurde nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch U46619 kontrahierte Gefäßringe nicht durch Applikation von Cromakalim relaxiert werden konnten. Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation der Gefäßringe (+)fat und (-)fat mit Serotonin (2  $\mu$ M) den beschriebenen Unterschied in der kontraktilen Antwort der beiden Gefäßgruppen zur Folge. Die Applikation von Cromakalim (100 nM) auf die durch Serotonin präkontrahierten Ringe resultierte in einer kompletten Relaxation beider Gruppen von Gefäßringen. Dies war nicht der Fall, wenn die Gefäßringe mit U46619 präkontrahiert wurden. Es zeigte sich kein Unterschied in der kontraktilen Antwort zwischen (+)fat und (-)fat. Nachfolgende Applikation von Cromakalim (100 nM) resultierte in keiner Relaxation.

Diese Ergebnisse sind eine weitere Bekräftigung der Hypothese, dass der antikontraktile Effekt der Gefäßringe (+)fat an der Mesenterialarterie durch einen von periadventitiellen Adipozyten sezernierten Faktor vermittelt wird, der Eigenschaften eines Kaliumkanalöffners aufweist. Wenn ein synthetischer Kaliumkanalöffner, wie Cromakalim, nicht in der Lage ist, durch U46619 induzierte Kontraktionen zu relaxieren, so trifft das aller Wahrscheinlichkeit nach auch auf andere Kaliumkanalöffner zu. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass auch ein ADRF, der Eigenschaften eines Kaliumkanalöffners aufweist, durch U46619 ausgelöste Kontraktionen nicht relaxieren kann. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass glattmuskuläre Kaliumkanäle durch U46619 blockiert werden und dadurch ADRF seine Wirkung nicht entfalten kann.

#### **5.2.4 K<sub>v</sub>-Kaliumkanäle als Vermittler des antikontraktilen Effekts an der Mesenterialarterie der Ratte**

Die bis zu diesem Punkt diskutierten Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass der antikontraktile Effekt, der in den Gefäßringpräparationen (+)fat beobachtet wurde, durch die Aktivierung von Kaliumkanälen zustande kommt. In der Folge sollte nun geklärt werden, welcher Kaliumkanaltyp in der glatten Gefäßmuskulatur die antikontraktile Wirkung des Fettgewebes vermittelt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Blocker von glattmuskulären K<sup>+</sup>-Kanälen eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation von zwei spezifischen  $K_V$ -Kanal-Blockern, 4-AP (2 mM) und 3,4-DAP (1 mM) eine nahezu vollständige Hemmung des antikontraktilen Effekts des perivaskulären Fettgewebes bei den Gefäßringen (+)fat zur Folge hatte. Die kontraktile Antwort der Gefäßringe (-)fat blieb nach Applikation von 2 mM 4-AP und 1 mM 3,4-DAP nahezu unverändert. Glibenclamid (3  $\mu$ M) und Apamin (1  $\mu$ M) hatten keinen Einfluss auf Serotonin-abhängige Kontraktionen von Gefäßringen (+)fat und (-)fat. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass glattmuskuläre  $K_V$ -Kanäle den antikontraktilen Effekt von perivaskulärem Fettgewebe in der Mesenterialarterie vermitteln. Hingegen scheinen  $K_{ATP}$ - und SK-Kanäle nicht an dieser Wirkung beteiligt zu sein.

In Patch-Clamp-Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass langsam-inaktivierende  $K_V$ -Kanäle in den glatten Gefäßmuskelzellen der hier verwendeten Gefäßpräparation exprimiert sind (Nelson *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1995). Diese Kanäle können mit 4-AP und 3,4-DAP blockiert werden, jedoch nicht mit TEA (Nelson *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu glatten Gefäßmuskelzellen sind  $K_V$ -Kanäle in Adipozyten schnell-inaktivierend, sensitiv auf TEA (Ramirez-Ponce *et al.*, 2003; Ringer *et al.*, 2000; Russ *et al.*, 1993) und relativ resistent gegenüber 4-AP (Ramirez-Ponce *et al.*, 2002; Ramirez-Ponce *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2000).

Zusätzlich konnte der Nachweis geliefert werden, dass das Membranpotential in glatten Gefäßmuskelzellen der Gefäßringe (+)fat negativer ist als in den Gefäßringen (-)fat (Verlohren *et al.*, 2003). Dieser Unterschied des Membranpotentials zwischen den Gefäßringen (+)fat und (-)fat ließ sich durch Applikation von 4-AP (2 mM) rückgängig machen. Die Daten sind eine weitere Bestätigung der Hypothese, dass glattmuskuläre  $K_V$ -Kanäle an der Vermittlung des antikontraktilen Effekts des perivaskulären Fettgewebes beteiligt sind.

Löhn *et al.* fanden für die Aorta der Ratte, dass Glibenclamid (3  $\mu$ M) die ADRF-Wirkung an den Gefäßringen (+)fat reduzierte. Die Inkubation der Gefäßringe (+)fat mit 3  $\mu$ M Glibenclamid und die erneute Stimulation mit 2  $\mu$ M Serotonin zeigten eine signifikante Reduktion des antikontraktilen Effekts (Löhn *et al.*, 2002). 4-AP (2 mM) hatte nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die antikontraktile Wirkung von perivaskulärem Fettgewebe. Sie interpretierten die Ergebnisse, dass ein

transferabler Faktor vom perivaskulären Fettgewebe in das Organbad sezerniert wird, der seine Wirkung zumindest zum Teil über die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen der glatten Muskelzelle entfaltet.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Löhn et al. an der Aorta hemmte 3  $\mu$ M Glibenclamid die antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes nicht, wohl aber eine Blockade von  $K_V$ -Kanälen mit 4-AP (2 mM) und 3,4-DAP (1 mM). Es gibt mehrere Möglichkeiten der Interpretation dieser scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse.

#### **5.2.4.1 Differentielle $K_{ATP}$ -Kanal-Expression in verschiedenen VSMC**

Eine mögliche Erklärung für die Beteiligung unterschiedlicher Kaliumkanäle an der ADRF-Wirkung an Aorta und Mesenterialarterie ist, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle in Aorta und Mesenterialarterie entsprechend ihrer unterschiedlichen anatomisch-physiologischen Lage und Funktion unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Elektrophysiologische Untersuchungen konnten belegen, dass  $K_{ATP}$ -Kanäle großer Leitfähigkeit ( $\sim 190$  pS), die sensitiv auf intrazelluläres ATP reagieren, in der Aorta, aber nicht in der Mesenterialarterie, gefunden wurden (Janigro *et al.*, 1993; Matzno *et al.*, 1995; Quayle *et al.*, 1995). In Mesenterialarterien der Ratte konnten  $K_{ATP}$ -Kanäle geringer Leitfähigkeit gefunden werden ( $\sim 25$  pS), die durch Nukleosiddiphosphate (UDP oder GDP) und ATP von der Innenseite der Zelle aus reguliert werden (Davie *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1995).

Darüber hinaus ist die molekulare Identität der  $K_{ATP}$ -Kanäle in Aorta und Mesenterialarterie nicht endgültig geklärt. Ein  $K_{ATP}$ -Kanal setzt sich aus vier Kir6.x-Untereinheiten (Kir 6.1 oder Kir 6.2), und vier Sulfonylharnstoff-Rezeptoren, SUR1 bzw. SUR2, zusammen. Die vier Kir6.x bilden die Kanalpore. SUR1 und SUR2 fungieren als regulatorische Untereinheiten. Zusätzlich gibt es mindestens zwei Splice-Varianten von SUR2, die als SUR2A und SUR2B bezeichnet werden (Wang *et al.*, 2003). Die Eigenschaften eines  $K_{ATP}$ -Kanals sind abhängig von der Zusammensetzung dieser Untereinheiten. Verschiedene Kombinationen von Kir6.x und SUR scheinen möglich, d.h. Homotetramere vs. Heterotetramere von Kir6.x in

Kombination mit Homotetramere vs. Heterotetramere von SUR1, SUR2A bzw. SUR2B. Der in der Mesenterialarterie der Ratte beschriebene  $K_{ATP}$ -Kanaltyp weist Eigenschaften auf, die am ehesten mit den biophysikalischen Eigenschaften des Kanals Kir6.1/SUR2B übereinstimmen (Wang *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 1997; Zhang, 1995; Zhang *et al.*, 1996), während diese Übereinstimmung für den  $K_{ATP}$ -Kanaltyp der Aorta noch nicht etabliert werden konnte (Miki *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2001). In der Aorta konnte eine Expression sowohl von Kir 6.1 und 6.2 und SUR2B nachgewiesen werden (Ren *et al.*, 2001). Zu den Eigenschaften des mesenterialen  $K_{ATP}$ -Kanaltyps gehört die oben beschriebene Stimulierbarkeit durch interne Nukleosiddiphosphate, weswegen der Kanaltyp auch  $K_{NDP}$ -Kanal genannt wird (Wang *et al.*, 2003).

Aufgrund dieser molekularen Diversität ist es möglich, dass aortale und mesenteriale  $K_{ATP}$ -Kanäle unterschiedlich auf ADRF reagieren.

#### 5.2.4.2 Differentielle $K_V$ -Kanal-Expression

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der Rolle der  $K_V$ -Kanäle bei der Vermittlung des ADRF-Effekts an der Mesenterialarterie, im Gegensatz zu den Daten der Aorta-Versuche, ist eine differentielle Expression der  $K_V$ -Kanäle in beiden Geweben.

Spannungsregulierte, verzögert rektifizierende  $K_V$ -Kanäle konnten in allen glatten Gefäßmuskelzellen, die bisher untersucht wurden, nachgewiesen werden (Nelson *et al.*, 1995).  $K_V$ -Kanäle leiten eine  $K^+$ -Auswärtsströmung, die das Membranpotential beeinflusst und zur Replolarisation von Aktionspotentialen beiträgt.

In funktionellen und elektrophysiologischen Untersuchungen konnte erforscht werden, dass  $K_V$ -Kanal-Blockierung mit 4-AP zu einer gesteigerten Antwort bei erhöhtem intravaskulärem Druck führt (Cole *et al.*, 1996). Für  $K_V$ -Kanäle wurde nachgewiesen, dass sie auch durch intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen reguliert werden, die die Aktivierung von PKA und PKC involvieren (Aiello *et al.*, 1998; Aiello *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1996; Waldron *et al.*, 1998). Für Zerebralarterien der Ratte belegte man, dass  $K_V$ -Kanal-Aktivierung durch Adenylatzyklasenaktivierung und Aktivierung der PKA durch  $PGI_2$ -Rezeptoraktivierung geschieht. (Waldron *et al.*, 1999). Eine Beteiligung von  $K_V$ -Kanälen an der



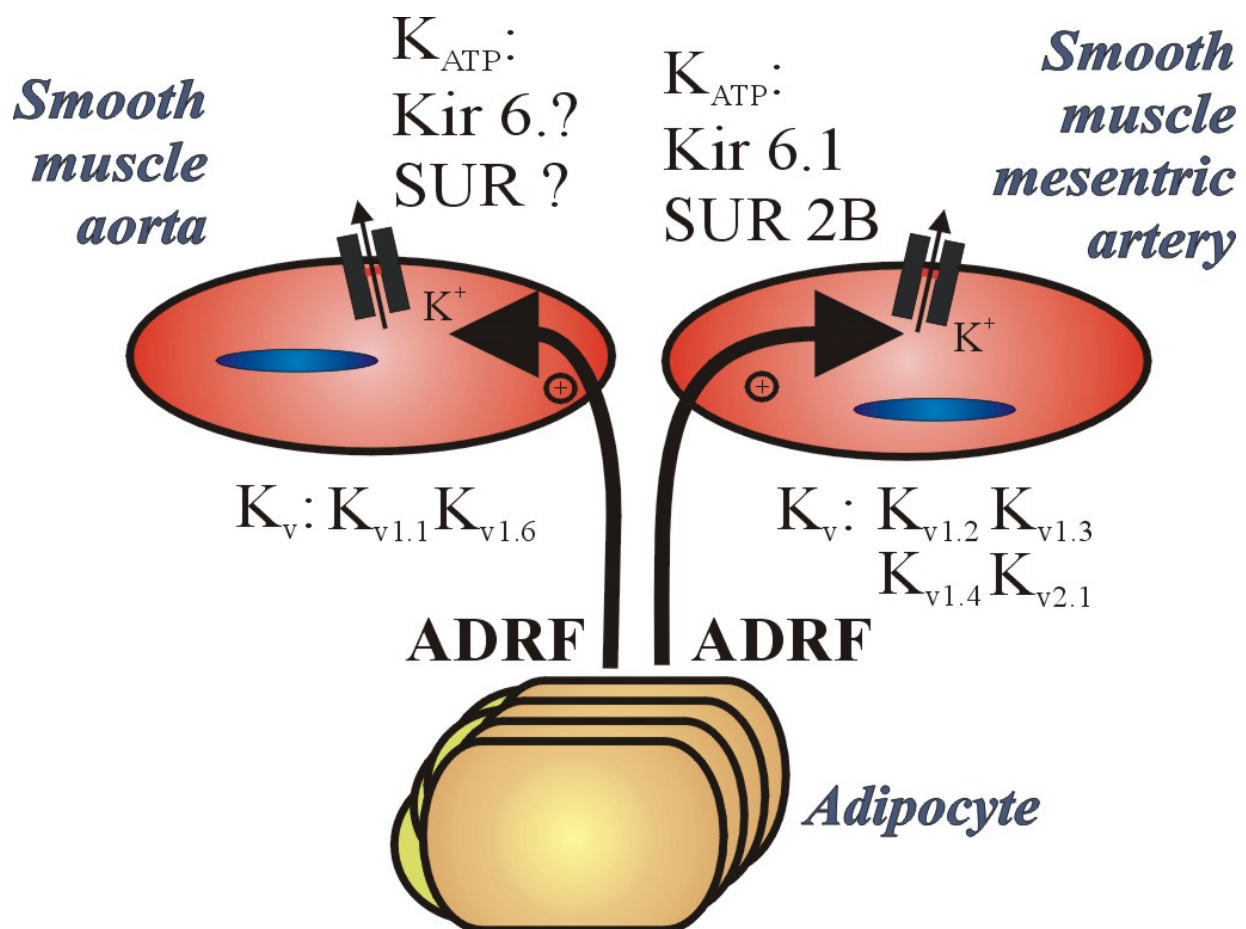
physiologischen Regulation des arteriellen Durchmessers durch lokal freigesetzte oder zirkulierende vasoaktive Faktoren ist damit wahrscheinlich (Cole *et al.*, 1996; Knot *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001; Terata *et al.*, 2000).

Die molekulare Identität von vaskulären, 4-AP sensitiven  $K_V$ -Kanälen ist noch nicht endgültig etabliert. In aktuellen Veröffentlichungen wurde jedoch die Expression verschiedener  $K_V$ -Kanal-Subtypen in VSMCs beschrieben. Ein  $K_V$ -Kanal setzt sich aus vier porenbildenden  $K_{V\alpha}$ -Untereinheiten und vier regulatorischen  $K_{V\beta}$ -Untereinheiten zusammen.  $K_{V\alpha}$ -Proteine werden von neun verwandten Genfamilien enkodiert,  $K_{V1-9}$ . Die Proteine formen homotetramere Kanäle oder vereinigen sich mit Mitgliedern der selben Familie zu heterotetrameren Kanälen (Martens *et al.*, 1999). Zusätzliche Verschiedenheit wird erreicht, wenn sich  $K_{V\alpha}$ -Untereinheiten mit verschiedenen  $K_{V\beta}$ -Untereinheiten zusammenlagern. Für  $K_{V\beta}$  Proteine kodieren 4 Gene,  $K_{V\beta1-4}$ , wobei Splice-Varianten von  $K_{V\beta1}$  und  $K_{V\beta2}$  identifiziert worden sind (Accili *et al.*, 1997; Heinemann *et al.*, 1996; Rhodes *et al.*, 1997; Trimmer, 1998).

Für Mesenterialarterien der Ratte konnte gezeigt werden, dass Kanalproteine der Genfamilien  $K_{V1.2}$ ,  $K_{V1.3}$ ,  $K_{V1.5}$  und  $K_{V2.1}$  sowie  $K_{V\beta1}$ ,  $K_{V\beta2}$  und  $K_{V\beta3}$  exprimiert werden (Cox *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1999). In der Aorta wurden dagegen die Kanaluntereinheiten von  $K_{V1.1}$  und  $K_{V1.6}$  exprimiert, die auch in der Pulmonalarterie vorkommen, nicht jedoch in der Mesenterialarterie (Xu *et al.*, 1999). Für die Pfortader der Ratte konnte die Struktur des dort exprimierten  $K_V$ -Kanaltyps auf einen heterotetrameren Kanal bestehend aus  $K_{V1.4}$ ,  $K_{V1.5}$ , sowie  $K_{V\beta1.2}$ ,  $K_{V\beta1.3}$  und  $K_{V\beta2.1}$  festgelegt werden (Thorneloe *et al.*, 2001). Eine weitere Studie konnte beweisen, dass es eine größere Dichte dieser Kanäle in der Mesenterialarterie als in der Aorta von Ratten gab (Cox *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser molekularen Vielfalt der Expression von  $K_V$ -Kanal-Untereinheiten kann es auf funktioneller Ebene zu Besonderheiten kommen. So ist für den  $K_V$ -Kanal der Pulmonalarterie beschrieben, dass Hypoxie  $K_V$ -Ströme reduziert. Das konnte für mesenteriale  $K_V$ -Kanäle nicht verifiziert werden (Yuan *et al.*, 1993). Diese Unterschiede weisen auf eine gewebsspezifische Expression und Regulation von  $K_{V\alpha}$ - sowie  $K_{V\beta}$ -Untereinheiten hin, die der Erfüllung von unterschiedlichen Aufgaben in verschiedenen Geweben dienen. Somit kann spekuliert werden, dass es

spezifische  $K_v$ -Kanaltypen in der Mesenterialarterie gibt, die die antikontraktile Wirkung von ADRF in der Mesenterialarterie vermitteln und nicht in der Aorta exprimiert werden. Es ist auch denkbar, dass es  $K_{ATP}$ -Kanaltypen gibt, die nicht in der Mesenterialarterie vorkommen, aber die antikontraktile Effekte von ADRF in der Aorta bewirken. Zusammengefasst könnte es sich bei ADRF um ein und denselben Faktor handeln, der verschiedene  $K^+$ -Kanaltypen reguliert. Diese Kanäle dienen als Zielstruktur für ADRF und werden differentiell in den verschiedenen Gefäßmuskelarten exprimiert. **Abb. 5.2** fasst diese Vorstellung schematisch zusammen.



**Abb. 5.2** Mögliche Verhältnisse bezüglich der  $K^+$ -Kanäle an Aorta und Mesenterialarterie. ADRF relaxiert aortale und mesenteriale Gefäßmuskelzellen durch Öffnung von  $K_{ATP}$ - bzw.  $K_v$ -Kanälen. Die molekulare Diversität der exprimierten  $K^+$ -Kanäle könnte die gewebespezifische Beteiligung von unterschiedlichen  $K^+$ -Kanälen am ADRF-Effekt in beiden Präparaten erklären. Hier liegt ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedliche Wirkungsweise des perivaskulären Fettgewebes. Für nähere Erläuterungen siehe Text.

Alternativ könnte ADRF an einen oder verschiedene ADRF-Rezeptoren binden und über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege  $K_V$ -Kanäle oder  $K_{ATP}$ -Kanäle in der Mesenterialarterie bzw. Aorta aktivieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass H-89 (9  $\mu$ M), KT5823 (0,5 $\mu$ M) und Tyrphostin A25 (10 $\mu$ M) nicht die Wirkung von ADRF an der Aorta hemmt. So ist zu vermuten, dass die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in der Aorta nicht durch Proteinkinase A, Proteinkinase G oder Tyrosinkinase vermittelt wird. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die ADRF-regulierten  $K_{ATP}$ - und  $K_V$ -Kanäle in den Gefäßmuskelzellen zu identifizieren und die beteiligten intrazellulären Signalwege zu charakterisieren. Zukünftige Patch-Clamp-Untersuchungen an isolierten Gefäßmuskelzellen könnten den Nachweis der beteiligten  $K^+$ -Kanäle erbringen.

#### 5.2.4.3 Wirkung von TEA, TPeA und Iberitoxin

In den vorliegenden Versuchen bewirkten TEA (1 mM), TPeA (10  $\mu$ M) und Iberitoxin (100 nM) eine ca. 20-30%ige Steigerung der kontraktile Antwort in mesenterialarteriellen Gefäßringen (+)fat und (-)fat. Es ist möglich, dass diese Effekte durch Hemmung von BK-Kanälen induziert wurden. Iberitoxin (100 nM) hemmt spezifisch BK-Kanäle in Gefäßmuskelzellen (Nelson *et al.*, 1995). TEA und TPeA gehören zur Gruppe der quaternären Ammoniumionen (Yao *et al.*, 2000). Da die Effekte in beiden Gefäßringgruppen beobachtet wurden, sind BK-Kanäle vermutlich nicht an der antikontraktile Wirkung des perivaskulären Fettgewebes beteiligt.

Obwohl TPeA in der angewendeten Konzentration ein bekannter Blocker von vaskulären  $K_{ATP}$ -Kanälen ist (Kovacs *et al.*, 1991) und Cromakalim-induzierte Relaxationen von Arterien bewirkt (Yao *et al.*, 2000), wurden kürzlich auch hemmende Effekte auf BK-Kanäle in VSMC beschrieben (Yao *et al.*, 2000).

TEA blockiert in der angewendeten Konzentration (1 mM)  $K_{Ca}^{2+}$ -Kanäle in VSMC (Nelson *et al.*, 1995). Die Applikation von TEA führt beispielsweise in isobarischen Messungen an zerebralen Arterien des Hasen zur Konstriktion des Gefäßes durch Blockade von BK-Kanälen. In höheren Konzentrationen blockiert TEA auch andere

Kanäle, wie  $K_V$ -Kanäle ( $EC_{50}$ , 7 mM) und  $K_{ATP}$ -Kanäle ( $EC_{50}$ , 10 mM) (Nelson *et al.*, 1995). Andere Untersuchungen konnten eine Steigerung der kontraktilen Antwort auf verschiedene Vasokonstriktoren nach Inkubation mit TEA belegen (Champion *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit führte die Inkubation der Gefäßringe (+)fat und (-)fat mit TEA, Iberiotoxin und TPcA zu einer verstärkten kontraktilen Antwort auf erneute Stimulation mit Serotonin (2  $\mu$ M). In Einklang mit der Literatur ist diese verstärkte Kontraktion am ehesten mit der Hemmung von BK-Kanälen zu erklären, die einen hemmenden Einfluss auf den Gefäßtonus ausüben. Eine spezifische Inhibition des ADRF-Effekts durch TEA, TPcA oder Iberiotoxin trat hierbei nicht auf.

#### **5.2.4.4 Verschiedene ADRFs? Eine Analogie zu EDHF**

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den unterschiedlichen Wirkungsmechanismus des perivaskulären Fettgewebes von Aorta und Mesenterialarterie ist, dass das Fettgewebe verschiedene vasorelaxierende Faktoren (ADRFs) sezerniert. Möglicherweise besteht eine dem jeweiligen Gewebe angepasste Produktion von verschiedenen ADRFs.

Eine analoge Situation findet sich in dem vom Endothel der Blutgefäße gebildeten Hyperpolarisationsfaktor EDHF. In der derzeitigen Forschung gibt es verschiedene Hypothesen über Ursprung und Wirkung von EDHF. Epoxide der Arachidonsäure gelten als Kandidaten für diesen Faktor (Adeagbo *et al.*, 1993; Campbell, 1996; Campbell *et al.*, 1999; Cowan *et al.*, 1991; Mombouli *et al.*, 1997; Quilley *et al.*, 2000).

Quilley *et al.* fassten zusammen, dass verschiedene EDHFs existieren, die auf verschiedene Kanäle wirken, abhängig von untersuchter Spezies und untersuchtem Gefäßbett (Quilley *et al.*, 2000). Insbesondere die vaskuläre Aktivität der EETs ist abhängig von untersuchter Gefäßregion, Gewebe und Spezies. So konnte man zeigen, dass die vasodilatierende Wirkung von EETs mit geringer werdendem Durchmesser des Gefäßes zunimmt, was mit einer zunehmenden EDHF-Bedeutung an kleiner werdenden Gefäßen übereinstimmt (Quilley *et al.*, 2000). In der Aorta wird eine Produktion von EETs normalerweise nicht beobachtet (Pfister *et al.*, 1991).

Vasodilatatorische Wirkungen von EETs wurden vor allem in kleinen, mehr peripher gelegenen Gefäßregionen, wie intestinalen (Proctor *et al.*, 1987), zerebralen (Gebremedhin *et al.*, 1992), renalen (Zou *et al.*, 1996) und koronaren Arterien (Rosolowsky *et al.*, 1993; Rosolowsky *et al.*, 1996; Rosolowsky *et al.*, 1990), beobachtet. EETs hyperpolarisieren die VSMC, eine essentielle Eigenschaft eines EDHF-Kandidaten, durch Öffnung von  $K^+$ -Kanälen (Campbell *et al.*, 1996; Quilley *et al.*, 1997).

Analog zur Situation im Bereich der EDHF-Forschung ist eine solche Unterschiedlichkeit der exprimierten ADRFs, abhängig von untersuchter Gefäßregion und letztendlich Spezies, vorstellbar. Die Produktion von unterschiedlichen ADRFs könnte erklären, dass unterschiedliche  $K^+$ -Kanäle als Zielstrukturen in der Aorta und der Mesenterialarterie durch perivaskuläres Fettgewebe reguliert werden. **Abb. 5.3** fasst den Erklärungsansatz schematisch zusammen.

An dieser Stelle ist es wichtig zu bemerken, dass ADRF nicht EDHF ist. Die Beteiligung des Endothels an den ADRF-Wirkungen konnte durch mechanische Entfernung des Endothels ausgeschlossen werden, sowohl an der Aorta (Löhn *et al.*, 2002) als auch in den Untersuchungen in dieser Arbeit (Siehe **Abb. 4.14**). Zum jetzigen Zeitpunkt ist es jedoch noch nicht möglich, eine Aussage über die Identität von ADRF zu machen. Es fand ausschließlich eine indirekte Charakterisierung des Faktors mit pharmakologischen Mitteln statt. Weitergehenden Studien müssen sich anschließen, um den Faktor selbst zu isolieren und zu charakterisieren.

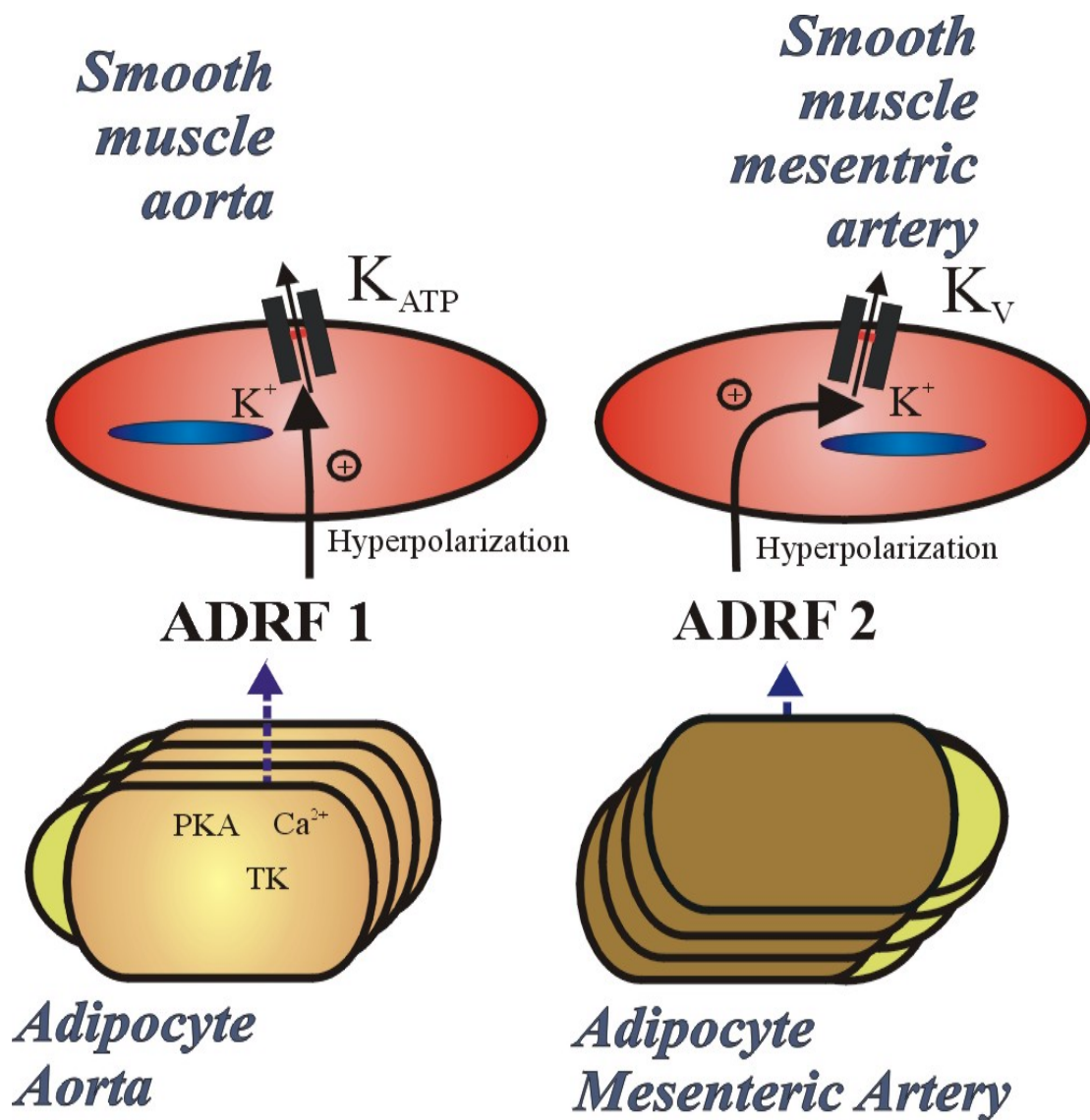


Abb. 5.3 Modell der möglichen Wirkungsweise von ADRF an Aorta und Mesenterialarterie. Mindestens zwei unterschiedliche ADRFs (ADRF 1, ADRF 2) werden vom perivaskulären Fettgewebe der Aorta bzw. Mesenterialarterie produziert. ADRF 1 relaxiert die Aorta durch Öffnung von glattmuskulären  $K_{ATP}$ -Kanälen, ADRF 2 die Mesenterialarterie durch Öffnung von  $K_V$ -Kanälen. ADRF1 und ADRF2 werden möglicherweise direkt aus den Adipozyten freigesetzt.

### **5.3 Perivaskuläres Fettgewebe und adipozytäre Dysfunktion – klinischer Bezug**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das perivaskuläre Fettgewebe sowohl der Aorta als auch der Mesenterialarterie der Ratte einen antikontraktilen Effekt auf die Gefäßringe (+)fat ausübt. Im Wirkmechanismus zeigten sich jedoch Unterschiede. Weitergehende Experimente müssen nun vor allem die biochemischen Eigenschaften von ADRF charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine pharmakologische Charakterisierung des Faktors und seiner Wirkung am Gefäßmuskel. Es muss herausgefunden werden, ob der Faktor (die Faktoren) aus dem Fettgewebe oder doch nur aus der Adventitia freigesetzt wird (werden). In dieser Richtung sollten sich weitere Studien anschließen.

Die Assoziation von Übergewicht mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie arteriellem Hypertonus und Adipositas ist seit langem klinisch nachgewiesen (Kannel *et al.*, 1967). Die frühe Gefäßschädigung durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und damit das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion sind wichtige pathogenetische Schritte auf dem Weg zu chronischen Gefäßkrankheiten des Menschen (Higashi *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Hypothese nachgegangen, ob das viszerale, periadventitielle Fettgewebe den Gefäßtonus von groß- und geringlumigen Arterien der Ratte reguliert. Geringlumige Mesenterialarterien sind eine wesentliche Determinante des TPR und direkt in viszerale Fettgewebe eingebettet. Es ist denkbar, dass ADRF eine Rolle in der Regulation des TPR und damit des Blutdrucks beim Menschen spielt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass das perivaskuläre Fettgewebe einen antikontraktilen Effekt auf Gefäßringe humaner Mesenterialarterien ausübt (Verlohren *et al.*, 2004). Eine Fehlfunktion des Fettgewebes bzw. eine Zunahme, z.B. bei Adipositas, hätte Auswirkungen auf den Gefäßtonus von Mesenterialarterien und möglicherweise auf den TPR und arteriellen Blutdruck. Viele Autoren bezeichnen Adipositas als einen pathologischen Zustand des adipozytären Organs, was sich auch an den morphologisch-funktionellen Merkmalen der Adipozyten (Hausman *et al.*, 2001), wie auch in einer veränderten

Expression adipozytenspezifischer Produkte wie Leptin (Considine *et al.*, 1996) und Adiponektin (Arita *et al.*, 1999) festmachen lässt.

Eine solche „adipozytäre Dysfunktion“ mit fehlgesteuerter Produktion von ADRF bei übergewichtigen und besonders fettleibigen Individuen stellt einen interessanten, neuartigen Erklärungsansatz für eine pathologische arterielle Gefäßregulation bei Adipositas und möglicherweise bei anderen chronischen Gefäßkrankheiten dar.



## 6 Zusammenfassung

In klinischen Studien konnte Adipositas als eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen identifiziert werden. Über die zugrunde liegenden Mechanismen herrscht weitgehend Unklarheit. Bei experimentellen Untersuchungen an isolierten Blutgefäßen in Organbad-Experimenten wurde bisher routinemäßig das die Blutgefäße umgebende periadventitielle Fettgewebe entfernt. Löhn *et al.* konnten zeigen, dass das periadventitielle Fettgewebe einen antikontraktilen Effekt auf die Aorta der Ratte ausübt. Es konnte die Existenz eines transferablen antikontraktilen Faktors nachgewiesen werden, der aus dem periadventitiellen Fettgewebe freigesetzt wird. Er erhielt den Namen ADRF: Adventitium-Derived Relaxing Factor (Löhn *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden zelluläre Mechanismen der Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta der Ratte untersucht. Es wurde die Wirkung des perivaskulären Fettgewebes auf Mesenterialarterien der Ratte mit Hilfe von isometrischen Kontraktionsmessungen an isolierten Gefäßringen untersucht. Es kamen Gefäßringpräparationen zum Einsatz, bei denen das umgebende periadventitielle Fettgewebe entfernt wurde [Gefäßringe (-)fat] oder intakt belassen wurde [Gefäßringe (+)fat]. Die wichtigsten Ergebnisse sind im Einzelnen:

1. Die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta ist ein kalziumabhängiger Prozess ( $EC_{50} \sim 4.7 \text{ mM}$ ). Durch den Einsatz von spezifischen Antagonisten der PKA (H-89,  $9 \text{ }\mu\text{M}$ ) und Tyrosinkinase (Tyrphostin A25  $10 \text{ }\mu\text{M}$ , Genistein  $10 \text{ }\mu\text{M}$ ) konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von ADRF aus dem periadventitiellen Fettgewebe der Aorta vermutlich über die intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle PKA und Tyrosinkinase reguliert wird.
2. Das periadventitielle Fettgewebe der Mesenterialarterie der Ratte zeigte einen antikontraktilen Effekt, wenn Gefäßringe (+)fat und (-)fat durch vasokonstriktorische Agonisten stimuliert wurden. Applikation von Serotonin, Phenylephrin und Endothelin I resultierten in einer bis zu 75 % abgeschwächten kontraktilen Antwort der Gefäßringpräparationen (+)fat im Vergleich zu Gefäßringen (-)fat. Die Applikation von U46619 resultierte in keiner signifikant unterschiedlichen kontraktilen Antwort. Cromakalim ( $100 \text{ nM}$ ) relaxierte

vollständig Serotonin-kontrahierte Gefäßringe (+)fat und (-)fat, aber konnte nicht U46619-kontrahierte Gefäßringe (+)fat und (-)fat relaxieren.

3. Bei Applikation von Kaliumchloridlösung (60 mM) bestand zwischen mesenterialarteriellen Gefäßringen (+)fat und (-)fat keine Differenz der kontraktilen Antwort. Die Blocker glattmuskulärer  $K_V$ -Kanäle 4-AP (2 mM) und 3,4-DAP (1 mM) konnten den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes aufheben. Im Gegensatz dazu konnten Blocker von  $K_{ATP}$ -Kanälen (Glibenclamid, 3  $\mu$ M), BK-Kanälen (Iberiotoxin, 100 nM), SK-Kanälen (Apamin, 1  $\mu$ M), sowie unspezifische Kaliumkanalblocker (TEA, 1 mM; TPcA, 10  $\mu$ M) den antikontraktilen Effekt nicht aufheben. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass  $K_V$ -Kanäle den antikontraktilen Effekt des perivaskulären Fettgewebes in der Mesenterialarterie der Ratte vermitteln.

Durch pharmakologische Versuchsprotokolle gelang die Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus von ADRF aus der Rattenaorta. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass perivaskuläres Fettgewebe eine antikontraktile Wirkung auf Mesenterialarterien der Ratte ausübt. Die Identität von ADRF ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt. Weitere Studien sollten an dieser Stelle folgen.

Die verminderte Freisetzung oder Wirkung eines vom perivaskulären Fettgewebe freigesetzten antikontraktilen Faktors stellt einen neuen Erklärungsansatz für die Ätiopathogenese Adipositas-assoziiierter kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Eine „Adipozytäre Dysfunktion“ könnte somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen durch Adipositas spielen.

## 7 *Literaturverzeichnis*

- AALKJAER, C. & MULVANY, M.J. (1983). Human and rat resistance vessels: a comparison of their morphological and pharmacological characteristics. *Gen Pharmacol*, **14**, 85-7.
- ACCILI, E.A., KIEHN, J., WIBLE, B.A. & BROWN, A.M. (1997). Interactions among inactivating and noninactivating Kvbeta subunits, and Kvalpha1.2, produce potassium currents with intermediate inactivation. *J Biol Chem*, **272**, 28232-6.
- ADEAGBO, A.S. & TRIGGLE, C.R. (1993). Varying extracellular [K<sup>+</sup>]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol*, **21**, 423-9.
- AIELLO, E.A., MALCOLM, A.T., WALSH, M.P. & COLE, W.C. (1998). Beta-adrenoceptor activation and PKA regulate delayed rectifier K<sup>+</sup> channels of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **275**, H448-59.
- AIELLO, E.A., WALSH, M.P. & COLE, W.C. (1995). Phosphorylation by protein kinase A enhances delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **268**, H926-34.
- ANDERSON, N.G. (1993). Growth hormone-induced protein tyrosine phosphorylation in 3T3-F442A cells. *Biochem Soc Trans*, **21**, 360S.
- ANGUS, J.A., WRIGHT, C.E. (2000). Techniques to study pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **44**, 395-407.
- ARITA, Y., KIHARA, S., OUCHI, N., TAKAHASHI, M., MAEDA, K., MIYAGAWA, J., HOTTA, K., SHIMOMURA, I., NAKAMURA, T., MIYAOKA, K., KURIYAMA, H., NISHIDA, M., YAMASHITA, S., OKUBO, K., MATSUBARA, K., MURAGUCHI, M., OHMOTO, Y., FUNAHASHI, T. & MATSUZAWA, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 79-83.
- ASHCROFT, S.J. & ASHCROFT, F.M. (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal*, **2**, 197-214.
- BRADLEY, K.K., JAGGAR, J.H., BONEV, A.D., HEPPNER, T.J., FLYNN, E.R.M, NELSON, M.T., HOROWITZ, B. (1999). Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J Physiol*, **515.3**, 639-651.
- BRENNER, R., PERÉZ, G.J., BONEV, A.D., ECKMAN, D.M., KOSEK, J.C., WILER, S.W., PATTERSON, A.J., NELSON, M.T., ALDRICH, R.W. (2000). Vasoregulation by the beta1-subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, **407**, 870-877.
- BRUNETTI, M., MASCETRA, N., MANARINI, S., MARTELLI, N., CERLETTI, C., MUSIANI, P., AIELLO, F.B., EVANGELISTA, V. (2002). Inhibition of cGMP-dependent protein kinases potently decreases neutrophil spontaneous apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 498-501.
- BUSSE, R., EDWARDS G., FÉLÉTOU M., FLEMING I., VANHOUTTE P.M., WESTON A.H (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 347-380.
- CAMPBELL, G.G., D; PRATT, P.F; HARDER DR (1996). Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ Res*, **78**, 415-423.
- CAMPBELL, G.H.D. (1999). Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors and Vascular Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Regulation of Tone. *Circ Res*, **84**, 484-488.

- CAMPBELL, W.B., DEETER, C., GAUTHIER, K.M., INGRAHAM, R.H., FALCK, J.R. & LI, P.L. (2002). 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid relaxes bovine coronary arteries by activation of K(Ca) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282**, H1656-64.
- CARO, C.P., TJ; SCHROTER, RC; SEED, WA (1978). *The mechanics of circulation*. New York-Toronto: Oxford University.
- CARVAJAL, J.A., GERMAIN, A.M., HUIDOBRO-TORO, J.P. & WEINER, C.P. (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*, **184**, 409-20.
- CASSIS, L.A., SAYE, J. & PEACH, M.J. (1988). Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension*, **11**, 591-6.
- CHAMPION, H.C. & KADOWITZ, P.J. (1997). Vasodilator responses to acetylcholine, bradykinin, and substance P are mediated by a TEA-sensitive mechanism. *Am J Physiol*, **273**, R414-22.
- CHEN, Y.T., VACCARINO, V., WILLIAMS, C.S., BUTLER, J., BERKMAN, L.F. & KRUMHOLZ, H.M. (1999). Risk factors for heart failure in the elderly: a prospective community-based study. *Am J Med*, **106**, 605-12.
- CHRISTENSEN, K.L. & MULVANY, M.J. (2001). Location of resistance arteries. *J Vasc Res*, **38**, 1-12.
- CINTI, S. (2000). Anatomy of the adipose organ. *Eat Weight Disord*, **5**, 132-42.
- CLEMENT-CHOMIENNE, O., WALSH, M.P. & COLE, W.C. (1996). Angiotensin II activation of protein kinase C decreases delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rabbit vascular myocytes. *J Physiol*, **495** ( Pt 3), 689-700.
- COHEN, R.A. & VANHOUTTE, P.M. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, **92**, 3337-49.
- COLE, W.C., CLEMENT-CHOMIENNE, O. & AIELLO, E.A. (1996). Regulation of 4-aminopyridine-sensitive, delayed rectifier K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle by phosphorylation. *Biochem Cell Biol*, **74**, 439-47.
- CONSIDINE, R.V., SINHA, M.K., HEIMAN, M.L., KRIAUCIUNAS, A., STEPHENS, T.W., NYCE, M.R., OHANNESIAN, J.P., MARCO, C.C., MCKEE, L.J., BAUER, T.L. & ET AL. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, **334**, 292-5.
- COWAN, C.L. & COHEN, R.A. (1991). Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am J Physiol*, **261**, H830-5.
- COX, R.H., FOLANDER, K. & SWANSON, R. (2001). Differential expression of voltage-gated K(+) channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, **37**, 1315-22.
- CRANDALL, D.L., HAUSMAN, G.J. & KRAL, J.G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*, **4**, 211-32.
- CRANE, G.J., GALLAGHER, N., DORA, K.A., GARLAND, C.J. (2003). Small- and intermediate-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol*, **553.1**, 183-189.
- CRANE, G.J.G., C.J. (2004). Thromboxanereceptor stimulation associated with loss of SK<sub>Ca</sub> activity and reduced EDHF responses in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **142**, 43-50.
- DARIMONT, C., VASSAUX, G., GAILLARD, D., AILHAUD, G. & NEGREL, R. (1994). In situ microdialysis of prostaglandins in adipose tissue: stimulation of prostacyclin release by angiotensin II. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **18**, 783-8.

- DART, C. & STANDEN, N.B. (1993). Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol*, **471**, 767-86.
- DAVIE, C.S., KUBO, M. & STANDEN, N.B. (1998). Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*, **125**, 1715-25.
- DING, H., KUBES, P. & TRIGGLE, C. (2000). Potassium- and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, **129**, 1194-200.
- DORA, K.A.G., C.J (2001). Properties of smooth muscle hyperpolarization and relaxation to K<sup>+</sup> in the rat isolated mesenteric artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H2424-H2429.
- DOUGHTY, J.M., PLANE, F. & PARKINGTON, P.D. (1999). Charybdotoxin and Apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **276**, H1107-1112.
- DREXLER, H. (2000). *Endothelfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen*. Bremen.
- DUBROVSKA, G., VERLOHREN, S., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. (2003). Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **268**.
- EDWARDS, F.R., HIRST, G.D. & SILVERBERG, G.D. (1988). Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol*, **404**, 455-66.
- EDWARDS, G., DORA, K.A., GARDENER, M.J., GARLAND, C.J. & WESTON, A.H. (1998). K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*, **396**, 269-272.
- ENGELI, S. & SHARMA, A.M. (2002). Emerging concepts in the pathophysiology and treatment of obesity-associated hypertension. *Curr Opin Cardiol*, **17**, 355-9.
- ENGELI, S. & SHARMA, A.M. (2001). The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. *J Mol Med*, **79**, 21-9.
- ENGELI, S. & SHARMA, A.M. (2000). Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res*, **32**, 485-99.
- FENG, J., ITO, M., KUREISHI, Y., ICHIKAWA, K., AMANO, M., ISAKA, N., OKAWA, K., IWAMATSU, A., KAIBUCHI, K., HARTSHORNE, D.J., AND NAKANO, T. (1999). Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle. *J Biol Chem*, **274**, 3744-3752.
- FREDRIKSSON, J.M., LINDQUIST, J.M., BRONNIKOV, G.E. & NEDERGAARD, J. (2000). Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a beta -adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *J Biol Chem*, **275**, 13802-11.
- FURCHGOTT, R.F. & ZAWADZKI, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-6.
- GARLAND, J.G. & MCPHERSON, G.A. (1992). Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **105**, 429-35.
- GAUTHIER, K.M., SPITZBARTH, N., EDWARDS, E.M., CAMPBELL, W.B. (2004). Apamin-sensitive K currents mediate arachidonic acid-induced relaxations of rabbit aorta. *Hypertension*, **43**[part2], 413-419.
- GEBREMEDHIN, D., MA, Y.H., FALCK, J.R., ROMAN, R.J., VANROLLINS, M. & HARDER, D.R. (1992). Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, **263**, H519-25.

- GOLLASCH, M., BYCHKOV, R., RIED, C., BEHRENDT, F., SCHOLZE, S., LUFT, F.C. & HALLER, H. (1995). Pinacidil relaxes porcine and human coronary arteries by activating ATP-dependent potassium channels in smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 681-92.
- GOLLASCH, M., LÖHN, M., FÜRSTENAU, M., NELSON, MT., LUFT, FC., HALLER, H. (2000). Ca<sup>2+</sup> channels, quantized Ca<sup>2+</sup> release, and differentiation of myocytes in the cardiovascular system. *J Hypertens*, **18**, 989-998.
- GOLLASCH, M., RIED, C., BYCHKOV, R., LUFT, F.C. & HALLER, H. (1996). K<sup>+</sup> currents in human coronary artery vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **78**, 676-88.
- GOLLASCH, M., TANK, J., LUFT, FC., JORDAN, J., MAASS, P., KRASKO, C., SHARMA, AM., BUSJAHN, A., BÄHRING, S: (2002). The BK channel beta1 subunit gene is associated with human baroreflex and blood pressure regulation. *J Hypertens*, **20**, 927-933.
- GOLLASCH, M., WELLMAN, CG., KNOT, HJ., JAGGAR, JH., DAMON, DH., BONEV, AD., NELSON, MT (1998). Ontogeny of local sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> signals in cerebral arteries. *Circ Res*, **83**, 1104-1114.
- GUTTERMAN, D.D. (1999). Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol*, **277**, H1265-72.
- HAUSMAN, D.B., DIGIROLAMO, M., BARTNESS, T.J., HAUSMAN, G.J. & MARTIN, R.J. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*, **2**, 239-54.
- HEINEMANN, S.H., RETTIG, J., GRAACK, H.R. & PONGS, O. (1996). Functional characterization of Kv channel beta-subunits from rat brain. *J Physiol*, **493** ( Pt 3), 625-33.
- HIGASHI, Y., SASAKI, S., NAKAGAWA, K., MATSUURA, H., CHAYAMA, K. & OSHIMA, T. (2001). Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. *Am J Hypertens*, **14**, 1038-45.
- HILLE, B. (1992). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland MA: Sinauer.
- HIRST, G.D., SILVERBERG, G.D. & VAN HELDEN, D.F. (1986). The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *J Physiol*, **371**, 289-304.
- HUXLEY, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, **164**, 1356-65.
- JACKSON, W.F., KONIG, A., DAMBACHER, T. & BUSSE, R. (1993). Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*, **264**, H238-43.
- JAGGAR, J.H., MAWE, G.M. & NELSON, M.T. (1998a). Voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from mouse gallbladder. *Am J Physiol*, **274**, G687-93.
- JAGGAR, J.H., WELLMAN, G.C., HEPPNER, T.J., PORTER, V.A., PEREZ, G.J., GOLLASCH, M., KLEPPISCH, T., RUBART, M., STEVENSON, A.S., LEDERER, W.J., KNOT, H.J., BONEV, A.D. & NELSON, M.T. (1998b). Ca<sup>2+</sup> channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta Physiol Scand*, **164**, 577-87.
- JANIGRO, D., WEST, GA., GORDON EL., WINN HR., (1993). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat aorta and brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol*, **265**, C812-21.
- KANNEL, W.B., LEBAUER, E.J., DAWBER, T.R. & MCNAMARA, P.M. (1967). Relation of body weight to development of coronary heart disease. The Framingham study. *Circulation*, **35**, 734-44.

- KEEF, K.D., HUME, J.R. & ZHONG, J. (2001). Regulation of cardiac and smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $\text{Ca}_v1.2a,b$ ) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**, C1743-56.
- KENCHIAH, S., EVANS, J.C., LEVY, D., WILSON, P.W., BENJAMIN, E.J., LARSON, M.G., KANNEL, W.B. & VASAN, R.S. (2002). Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*, **347**, 305-13.
- KIMURA, K., TSUDA, K., BABA, A., KAWABE, T., BOH-OKA, S., IBATA, M., MORIWAKI, C., HANO, T. & NISHIO, I. (2000). Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 745-9.
- KLEIN, J., FASSHAUER, M., ITO, M., LOWELL, B.B., BENITO, M. & KAHN, C.R. (1999).  $\beta(3)$ -adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem*, **274**, 34795-802.
- KLEPPISCH, T. & NELSON, M.T. (1995a). Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via  $A_2$  receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 12441-5.
- KLEPPISCH, T. & NELSON, M.T. (1995b). ATP-sensitive  $K^+$  currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation. *Am J Physiol*, **269**, H1634-40.
- KNOT, H.J. & NELSON, M.T. (1995). Regulation of membrane potential and diameter by voltage-dependent  $K^+$  channels in rabbit myogenic cerebral arteries. *Am J Physiol*, **269**, H348-55.
- KOHLER, M., HIRSCHBERG, B., BOND, C.T., KINZIE, J.M., MARRION, N.V., MAYLIE, J. & ADELMAN, J.P. (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, **273**, 1709-14.
- KOVACS, R.J. & NELSON, M.T. (1991). ATP-sensitive  $K^+$  channels from aortic smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers. *Am J Physiol*, **261**, H604-9.
- LAUTERBACH, B., BARBOSA-SICARD, E., WANG, M.H., HONECK, H., KARGEL, E., THEUER, J., SCHWARTZMAN, M.L., HALLER, H., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. & SCHUNCK, W.H. (2002). Cytochrome P450-dependent eicosapentaenoic acid metabolites are novel BK channel activators. *Hypertension*, **39**, 609-13.
- LEEMHUIS, J., BOUTILLIER, S., SCHMIDT, G., MEYER, D.K. T. (2002). The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. *J Pharmacol Exp Ther*, **300**, 1000-1007.
- LINDQUIST, J.M., FREDRIKSSON, J.M., REHNMARK, S., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. (2000).  $\beta_3$ - and  $\alpha_1$ -adrenergic  $\text{Erk}1/2$  activation is Src- but not Gi-mediated in Brown adipocytes. *J Biol Chem*, **275**, 22670-7.
- LIU, Y., TERATA, K., RUSCH, N.J. & GUTTERMAN, D.D. (2001). High glucose impairs voltage-gated  $K^+$  channel current in rat small coronary arteries. *Circ Res*, **89**, 146-52.
- LÖHN, M., DUBROVSKA, G., LAUTERBACH, B., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. & SHARMA, A.M. (2002). Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb J*, **16**, 1057-63.
- LUDMER, P.L., SELWYN, A.P., SHOOK, T.L., WAYNE, R.R., MUDGE, G.H., ALEXANDER, R.W. & GANZ, P. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, **315**, 1046-51.
- MARTENS, J.R., KWAK, Y.G. & TAMKUN, M.M. (1999). Modulation of  $K_v$  channel  $\alpha/\beta$  subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med*, **9**, 253-8.

- MATZNO, S., SATO, R., TAKAI, H., AIDA, Y., KARASAKI, S., OYAIZU, M., NAKAMURA, N. & KATORI, R. (1995). The effect of AL0671, a novel potassium channel opener, on potassium current in rat aortic smooth muscle cells. *Gen Pharmacol*, **26**, 1327-34.
- MCCARRON, J.G., QUAYLE, J.M., HALPERN, W. & NELSON, M.T. (1991). Cromakalim and pinacidil dilate small mesenteric arteries but not small cerebral arteries. *Am J Physiol*, **261**, H287-91.
- MCLELLAN, F. (2002). Obesity rising to alarming levels around the world. *Lancet*, **359**, 1412.
- MCPHERSON, G.A., KEILY, S.G. & ANGUS, J.A. (1991). Spasmolytic effect of cromakalim in dog coronary artery in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **343**, 519-24.
- MIKI, T., SUZUKI, M., SHIBASAKI, T., UEMURA, H., SATO, T., YAMAGUCHI, K., KOSEKI, H., IWANAGA T., NAKAYA, H., SEINO, S. (2002). Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med*, **8**, 466-72.
- MISTRY, D.K.G., C.J. (1998). Characteristics of single, large-conductance calcium-dependent potassium channels (BK<sub>Ca</sub>) from smooth muscle cells isolated from the rabbit mesenteric artery. *J Membr Biol*, **164**, 125-138.
- MOMBOULI, J.V. & VANHOUTTE, P.M. (1997). Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 252-6.
- MULLER, J.M., DAVIS, M.J. & CHILIAN, W.M. (1996). Coronary arteriolar flow-induced vasodilation signals through tyrosine kinase. *Am J Physiol*, **270**, H1878-84.
- MULVANY, M.J. & HALPERN, W. (1976). Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature*, **260**, 617-9.
- MURPHY, M.E. & BRAYDEN, J.E. (1995). Apamin-sensitive K<sup>+</sup> channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol*, **489** ( Pt 3), 723-34.
- MURPHY, T.V., SPURRELL, B.E. & HILL, M.A. (2002). Cellular signalling in arteriolar myogenic constriction: involvement of tyrosine phosphorylation pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **29**, 612-9.
- MURPHY, T.V., SPURRELL, B.E. & HILL, M.A. (2001). Tyrosine phosphorylation following alterations in arteriolar intraluminal pressure and wall tension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H1047-56.
- MURTHY, K.S., ZHOU, H., GRIDER J.R., MAKHLOUF, G.M. (2003). Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G1006-1016.
- MUST, A., SPADANO, J., COAKLEY, E.H., FIELD, A.E., COLDITZ, G. & DIETZ, W.H. (1999). The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama*, **282**, 1523-9.
- NAGAO, T. & VANHOUTTE, P.M. (1992). Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol*, **445**, 355-67.
- NAKASHIMA, M. & VANHOUTTE, P.M. (1995). Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp Ther*, **272**, 379-84.
- NELSON, M.T. & BRAYDEN, J.E. (1993). Regulation of arterial tone by calcium-dependent K<sup>+</sup> channels and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cardiovasc Drugs Ther*, **7 Suppl 3**, 605-10.



- NELSON, M.T., PATLAK, J.B., WORLEY, J.F. & STANDEN, N.B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*, **259**, C3-18.
- NELSON, M.T. & QUAYLE, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, **268**, C799-822.
- NOMA, A. (1983). ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*, **305**, 147-8.
- OUCHI, N., OHISHI, M., KIHARA, S., FUNAHASHI, T., NAKAMURA, T., NAGARETANI, H., KUMADA, M., OHASHI, K., OKAMOTO, Y., NISHIZAWA, H., KISHIDA, K., MAEDA, N., NAGASAWA, A., KOBAYASHI, H., HIRAOKA, H., KOMAI, N., KAIBE, M., RAKUGI, H., OGIHARA, T. & MATSUZAWA, Y. (2003). Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension*, **42**, 231-4.
- PARKINGTON, H.C., TARE, M., TONTA, M.A. & COLEMAN, H.A. (1993). Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response to acetylcholine. *J Physiol*, **465**, 459-76.
- PEIRIS, A.N., SOTHMANN, M.S., HOFFMANN, R.G., HENNES, M.I., WILSON, C.R., GUSTAFSON, A.B. & KISSEBAH, A.H. (1989). Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Ann Intern Med*, **110**, 867-72.
- PFISTER, S.L., FALCK, J.R. & CAMPBELL, W.B. (1991). Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta. *Am J Physiol*, **261**, H843-52.
- PLANE, F.G., C.J. (1996). Influence of contractile agonists on the mechanism of endothelium-dependent relaxation in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **119**, 191-193.
- PLÜGER, S., FAULHABER, J., FÜRSTENAU, M., LÖHN, M., WALDSCHÜTZ, R., GOLLASCH, M., HALLER, H., LUFT, F.C. & PONGS, O. (2000). Mice with disrupted BK channel  $\beta 1$  subunit gene feature abnormal Ca<sup>2+</sup> spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ Res*, **87**, e53-e60.
- PROCTOR, K.G., FALCK, J.R. & CAPDEVILA, J. (1987). Intestinal vasodilation by epoxyeicosatrienoic acids: arachidonic acid metabolites produced by a cytochrome P450 monooxygenase. *Circ Res*, **60**, 50-9.
- QIU, Y. & QUILLEY, J. (2001). Apamin/charybdotoxin-sensitive endothelial K<sup>+</sup> channels contribute to acetylcholine-induced, NO-dependent vasorelaxation of rat aorta. *Med Sci Monit*, **7**, 1129-36.
- QUAYLE, J.M., BONEV, A.D., BRAYDEN, J.E. & NELSON, M.T. (1994). Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *J Physiol*, **475**, 9-13.
- QUAYLE, J.M., BONEV, A.D., BRAYDEN, J.E. & NELSON, M.T. (1995). Pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Am J Physiol*, **269**, C1112-8.
- QUAYLE, J.M., MCCARRON, J.G., BRAYDEN, J.E. & NELSON, M.T. (1993). Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol*, **265**, C1363-70.
- QUILLEY, J. & MCGIFF, J.C. (2000). Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 121-4.
- QUILLEY, J.F.D.M.J. (1997). Hyperpolarizing Factors. *Biochem Pharm*, **54**, 1059-1070.
- RAMIREZ-PONCE, M.P., MATEOS, J.C., BELLIDO, J.A. (2003). Human adipose cells have voltage-dependent potassium currents. *J Membr Biol*, **196**, 129-34.
- RAMIREZ-PONCE, M.P., MATEOS, J.C., BELLIDO, J.A. (2002). Insulin increases the density of potassium channels in white adipocytes possible role in adipogenesis. *J Endocrinol*, **174**, 299-307.

- RAMIREZ-PONCE, M.P., MATEOS, J.C., CARRION, N., BELLIDO, J.A. (1996). Voltage-dependent potassium channels in white adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **223**, 250-6.
- REN, Y.J., XU, X.H., ZHONG, C.B., FENG, N. & WANG, X.L. (2001). Hypercholesterolemia alters vascular functions and gene expression of potassium channels in rat aortic smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin*, **22**, 274-8.
- RHODES, K.J., STRASSLE, B.W., MONAGHAN, M.M., BEKELE-ARCURI, Z., MATOS, M.F. & TRIMMER, J.S. (1997). Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K<sup>+</sup> channel complexes. *J Neurosci*, **17**, 8246-58.
- RINGER, E., RUSS, U., SIEMEN, D. (2000). Beta(3)-adrenergic stimulation and insulin inhibition of non-selective cation channels in white adipocytes of the rat. *Biochim Biophys Acta*, **1463**, 241-53.
- ROBERTSON, B.E. & NELSON, M.T. (1994). Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol*, **267**, C1589-97.
- ROBERTSON, B.E., SCHUBERT, R., HESCHELER, J. & NELSON, M.T. (1993). cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **265**, C299-303.
- ROSOLOWSKY, M. & CAMPBELL, W.B. (1993). Role of PGI<sub>2</sub> and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. *Am J Physiol*, **264**, H327-35.
- ROSOLOWSKY, M. & CAMPBELL, W.B. (1996). Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, **1299**, 267-77.
- ROSOLOWSKY, M., FALCK, J.R., WILLERSON, J.T. & CAMPBELL, W.B. (1990). Synthesis of lipoxygenase and epoxigenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res*, **66**, 608-21.
- RUSS, U., RINGER, T., SIEMEN, D. (1993). A voltage-dependent and a voltage-independent potassium channel in brown adipocytes of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1993, **1153**, 249-56.
- SCHUBERT, R., LEHMANN, G., SEREBRYAKOV, V.N., MEWES, H. & HOPP, H.H. (1999). cAMP-dependent protein kinase is in an active state in rat small arteries possessing a myogenic tone. *Am J Physiol*, **277**, H1145-55.
- SCORNIK, F.S.T., L. (1992). U46619, a thromboxane A<sub>2</sub> agonist, inhibits K<sub>Ca</sub> channel activity from pig coronary artery. *Am J Physiol*, **262**, C708-713.
- SHARMA, A.M., ENGELI, S. & PISCHON, T. (2001). New developments in mechanisms of obesity-induced hypertension: role of adipose tissue. *Curr Hypertens Rep*, **3**, 152-6.
- SHUM, W.W., LE, G.Y., JONES, R.L., GURNEY, A.M., SASAKI, Y. (2003). Involvement of Rho-kinase in contraction of guinea-pig aorta induced by prostanoid EP(3) receptor agonists. *Br J Pharmacol*, **139**, 1449-1461.
- SMIRNOV, S.V. & AARONSON, P.I. (1992). Ca<sup>2+</sup> currents in single myocytes from human mesenteric arteries: evidence for a physiological role of L-type channels. *J Physiol*, **457**, 455-75.
- SOLTIS, E.E. & CASSIS, L.A. (1991). Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A*, **13**, 277-96.
- SORDELLA, R., JIANG, W., CHEN, G.C., CURTO, M. & SETTLEMAN, J. (2003). Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell*, **113**, 147-58.

- SPURRELL, B.E., MURPHY, T.V. & HILL, M.A. (2000). Tyrosine phosphorylation modulates arteriolar tone but is not fundamental to myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H373-82.
- STANDEN, N.B., QUAYLE, J.M., DAVIES, N.W., BRAYDEN, J.E., HUANG, Y. & NELSON, M.T. (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science*, **245**, 177-80.
- SUZUKI, M., LI, R.A., MIKI, T., UEMURA, H., SAKAMOTO, N., OHMOTO-SEKINE, Y., TAMAGAWA, M., OGURA, T., SEINO, S., MARBAN, E., NAKAYA, H. (2001). Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium-channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res*, **88**, 570-7.
- TERATA, K., MIURA, H., LIU, Y., LOBERIZA, F. & GUTTERMAN, D.D. (2000). Human coronary arteriolar dilation to adrenomedullin: role of nitric oxide and K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, H2620-6.
- THORNELOE, K., CHEN, T.T., KERR, P.M., GRIER, E.F., HOROWITZ, B., COLE, W.C., WALSH M.P. (2001). Molecular Composition of 4-Aminopyridine-Sensitive Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels of Vascular Smooth Muscle. *Circ Res*, **89**, 1030-1037.
- TRIMMER, J.S. (1998). Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 370-4.
- VANHEEL, B., VAN DE VOORDE, J. & LEUSEN, I. (1994). Contribution of nitric oxide to the endothelium-dependent hyperpolarization in rat aorta. *J Physiol*, **475**, 277-84.
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. (2004). Control of arterial tone by perivascular adipose tissue. *Recent Res Devel Physiol*, **2** (in print).
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., TSANG, S.Y., ESSINE, K., LUFT, F.C., HUANG, Y. & GOLLASCH, M. (2003). Visceral Perivascular Adipose Tissue regulates arterial tone of small mesenteric arteries (abstract). *J Hypertension*, **21**, S224.
- WALDRON, G.J. & COLE, W.C. (1999). Activation of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**, 180-4.
- WALDRON, G.J., SIGURDSSON, S.B., AIELLO, E.A., HALAYKO, A.J., STEPHENS, N.L. & COLE, W.C. (1998). Delayed rectifier K<sup>+</sup> current of dog bronchial myocytes: effect of pollen sensitization and PKC activation. *Am J Physiol*, **275**, L336-47.
- WALKER, S.D., DORA, K.A., INGS, N.T., CRANE C.J. AND GARLAND, C.J. (2001). Activation of endothelial cell I<sub>K<sub>Ca</sub></sub> and 1-ethyl-2-benzimidazolinone evokes smooth muscle hyperpolarization in rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **134**, 1548-1554.
- WANG, X.W., JI, L., CHEN, F., WANG, R., JIANG, C. (2003). Hypercapnic acidosis activates KATP-channels in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **92**, 1225-32.
- WANG, Y., KUMAR, R., WAGNER, M.B., CHENG, J., MISHRA, M., JOYNER, R.W. (2002). Regulation of transient outward current in human atrial myocytes by protein tyrosine kinase pathway. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **13**, 927-935.
- WELLMAN, G.C., QUAYLE, J.M. & STANDEN, N.B. (1998). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol*, **507** ( Pt 1), 117-29.
- WILSON, S.M., LEE, S.C., SHOOK, S., PAPPONE, P.A. (2000). ATP and beta-adrenergic stimulation enhance voltage-gated K current inactivation in brown adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **279**, C1847-58.
- XU, C., LU, Y., TANG, G. & WANG, R. (1999). Expression of voltage-dependent K<sup>+</sup> channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **277**, G1055-63.

- YAMADA, M., ISOMOTO, S., MATSUMOTO, S., KONDO, C., SHINDO, T., HORIO, Y. & KURACHI, Y. (1997). Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol*, **499** ( Pt 3), 715-20.
- YAN, M., LIU, D.L., CHUA, Y.L., CHEN, C. & LIM, Y.L. (2002). Tyrosine kinase inhibitors suppress alpha1-adrenoceptor mediated contraction in human radial, internal mammary arteries and saphenous vein. *Neurosci Lett*, **333**, 171-4.
- YAO, X. & HUANG, Y. (2000). Endothelium-dependent relaxation by tetraoctylammonium ions in rat isolated aortic rings. *Life Sci*, **66**, PL13-9.
- YUAN, X.J., GOLDMAN, W.F., TOD, M.L., RUBIN, L.J. & BLAUSTEIN, M.P. (1993). Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol*, **264**, L116-23.
- ZARITSKY J.J., E.D., WELLMAN G.C., NELSON M.T., SCHWARZ T.L. (2000). Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 Genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in K<sup>+</sup> mediated vasodilatation. *Circ Res*, **87**, 160-166.
- ZHANG, H., BOLTON, TB. (1995). Activation by intracellular GDP, metabolic inhibition and pinacidil of a glibenclamide-sensitive K-channel in smooth muscle cells of rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, **114**, 662-72.
- ZHANG, H.L. & BOLTON, T.B. (1996). Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, **118**, 105-14.
- ZHANG, Y., MATHENY, M., ZOLOTUKHIN, S., TUMER, N. & SCARPAGE, P.J. (2002). Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta*, **1584**, 115-22.
- ZOU, A.P., FLEMING, J.T., FALCK, J.R., JACOBS, E.R., GEBREMEDHIN, D., HARDER, D.R. & ROMAN, R.J. (1996). Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+) -channel activity. *Am J Physiol*, **270**, F822-32.

## **8            *Danksagung***

Herrn Prof. Dr. med. F. C. Luft danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut wissenschaftlich zu arbeiten.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Gollasch für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und die damit verbundene experimentelle Arbeit in seinem Labor aussprechen. Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Gollasch verfolgte das Entstehen dieser Arbeit mit großem Interesse, vielen wertvollen Anregungen und wichtiger konstruktiver Kritik.

Bei Herrn Prof. Dr. Huang Yu sowie seinem Team möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, in seinem Labor die der Arbeit zugrunde liegenden Methoden zu erlernen. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. A. Sharma für wertvolle Anregungen.

Ich möchte dem Team der Arbeitsgruppe Gollasch für Hilfe, Ratschläge und eine nette Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Frau Dr. G. Dubrovskaja, Herrn K. Essine und Frau Dr. B. Lauterbach.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau D. Herold für ausgiebige Hilfestellungen in vielen Situationen.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Geduld und fortwährende Unterstützung bedanken.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit Mitteln der Studentischen Forschungsförderung der Charité unterstützt.

## 9 *Lebenslauf*

### PERSÖNLICHE DATEN

**Stefan Verlohren**

geboren am 03.04.1976 in Leipzig

### SCHULBILDUNG

1982 - 1989      Grundschule und weiterführende Oberschule Weimar

1990 - 1995      Gymnasium Leopoldinum Detmold

1992 - 1993      Plano East Senior Highschool, Plano, Texas, USA

### ZIVILDIENTST

1995 - 1996      Rettungssanitäter, Rettungswache Detmold

### STUDIUM

1996 - 1998      Studium der Geschichte und Philosophie, Philipps-Universität Marburg

1998 - 2001      Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg

2000      Physikum

2001      1. Staatsexamen

seit 2001      Studium der Humanmedizin, Humboldt-Universität Berlin

2003      2. Staatsexamen

2004      3. Staatsexamen, Approbation zum Arzt

### PROMOTION

2001 - 2004      Dissertation an der Franz-Volhard-Klinik, Charité Campus Buch, Prof. Luft, AG Gollasch. Thema: „Der Einfluss des periadventitiellen Fettgewebes auf die Kontraktilität von Arterien der Ratte“

2001      Forschungsaufenthalt an der Chinese University of Hongkong, Institut für Physiologie, Hongkong, China

2002 - 2003      Wissenschaftliche Hilfskraft, AG Gollasch, Franz-Volhard-Klinik, Berlin

### PRAKTISCHE TÄTIGKEIT

2000 - 2001      Studentische Hilfskraft, Institut für Anatomie, Philipps-Universität Marburg

2000 - 2002      Famulaturen im Fach Chirurgie (Charité Campus Mitte, Berlin), Innere Medizin (Charité Campus Buch, Berlin), HNO (Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Frankreich), Gynäkologie (Praxis für Frauenheilkunde, Dr. A. Eisinger, Berlin)

2003 - 2004      Praktisches Jahr: Innere Medizin (Charité Campus Buch, Berlin), Chirurgie (Centre Hospitalier Universitaire Vaudoise, Lausanne, Schweiz), Gynäkologie (Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin)

**ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT**

seit    2004      Assistenzarzt an der Klinik für Geburtsmedizin, Charité Campus Virchow-Klinikum, Berlin

**SPRACHKENNTNISSE**

Englisch und Französisch fließend in Wort und Schrift

Berlin, den 01. Februar 2005

## 10 **Publikationen**

### 10.1 **Originalarbeiten**

- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. (2003). Perivaskuläres Fett: ein Regulator des periphären Widerstands? *J Hypertonie*, **7**, 20-24
- DUBROVSKA, G., VERLOHREN, S., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. (2004). Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**, H1107-H1113
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. (2004). Control of arterial tone by perivascular adipose tissue. *Recent Res Devel Physiol*, **2**, 259-264
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., TSANG, S.Y., ESSINE, K., LUFT F.C., YU H. & GOLLASCH M. (2004). Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*, **44**, 271-276.

### 10.2 **Abstracts**

- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., TSANG, S.Y., ESSINE, K., LUFT F.C., HUANG, Y. & GOLLASCH M. (2003). Visceral perivascular adipose tissue regulates arterial tone of small mesenteric arteries. *Nephrol Dial Transplant*, **18** (Suppl. 4), 573.
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., TSANG, S.Y., ESSINE, K., LUFT, F.C., HUANG, Y., GOLLASCH, M. (2003). Visceral perivascular adipose tissue regulates arterial tone of small mesenteric arteries (abstract). *J Hypertension*, **21** (Suppl. 4), S224.
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., TSANG, S.Y., ESSINE, K., LUFT, F.C., HUANG, Y. & GOLLASCH M. (2003). Perivascular adipose tissue regulates the arterial tone of small mesenteric arteries by opening smooth muscle K<sub>V</sub>-channels. *Hypertension*, **42**, 627-648.
- VERLOHREN, S., DUBROVSKA, G., TSANG, S.Y., ESSINE, K., LUFT, F.C., HUANG, Y. & GOLLASCH M. (2003). Visceral perivascular adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *JASN*, **14** (abstracts issue), 28A
- DUBROVSKA, G., VERLOHREN, S., LUFT, F.C., GOLLASCH, M. (2003). Mechanisms of ADRF-Release from rat aortic periadventitial adipose tissue. *JASN*, **14** (abstracts issue), 144A.



## **11        *Erklärung***

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Teile der Arbeit sind bereits publiziert oder in Manuskriptform in Bearbeitung. Die Abbildungsbeschriftungen erfolgten deshalb in englischer Sprache.

Berlin, den 01.02.2005

Stefan Verlohren